

**HERSTELLUNG
UND CHARAKTERISIERUNG
VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN
GEGEN OBERFLÄCHENANTIGENE
VON T-LYMPHOZYTEN
BEIM HAUSHUHN**

Hermann Ammer

Disbui. München

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554824_0055

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Uli Lösch

HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG
VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN
GEGEN
OBERFLÄCHENANTIGENE VON T-LYMPHOZYTEN
BEIM HAUSHUHN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
HERMANN AMMER
aus
Simbach a. Inn

München 1989

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse
Referent: Univ.-Prof. Dr. U. Lösch
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Kösters

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

Inhaltsverzeichnis:	Seite
1	EINLEITUNG 1
2	LITERATURÜBERSICHT 2
2.1	Immunsystem 2
2.2	Möglichkeiten der Differenzierung einzelner Lymphozytenpopulationen 3
2.3	T-Zell-Reifung 4
2.4	Differenzierungsantigene reifer T-Lymphozyten 6
2.4.1	CD3-Antigen 6
2.4.2	CD4-Antigen 7
2.4.3	CD8-Antigen 8
2.5.	T-Zell-Rezeptor 8
3	MATERIALIEN UND METHODEN 11
3.1	<u>Materialien</u> 11
3.1.1	Regelmäßig verwendete Lösungen, Medien und Puffer 11
3.1.2	Kontrollantikörper 12
3.1.3	Tiermaterial 13
3.1.3.1	Mäuse 13
3.1.3.2	Hühner 14
3.1.3.3	"TCR3" exprimierende Hühner 14
3.1.4	Zellmaterial 15
3.1.4.1	Isolierung von peripheren mononukleären Blut- zellen (PBMC) 15
3.1.4.2	Isolierung von Bursa- und Thymuszellen 16
3.1.4.3	Isolierung von Milzzellen 16
3.1.4.4	Myelomzelllinie 17
3.2	<u>Methoden</u> 17
3.2.1	Zellzählung 17
3.2.2	Anfertigung eines Zytozentrifugenpräparates 18
3.2.3	Herstellung monoklonaler Antikörper 19
3.2.3.1	Immunisierung der BALB/c Mäuse 19
3.2.3.2	Zellfusion 22

3.2.3.3	Kultivierung der Hybridomzellen	23
3.2.3.4	Nachweis der gegen Hühnerlymphozyten gerichteten monoklonalen Antikörper	24
3.2.3.4.1	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	24
3.2.3.4.2	Indirekter Immunofluoreszenztest (IIF)	27
3.2.3.5	Zellklonierung	28
3.2.3.6	Kryokonservierung von Hybridomzellen	29
3.2.3.7	Massenproduktion monoklonaler Antikörper in vivo	31
3.2.4	Bestimmung der Titer monoklonaler Antikörper in den verwendeten Nachweissystemen	31
3.2.5	Charakterisierung monoklonaler Antikörper	32
3.2.5.1	Bestimmung der Immunglobulinklassen und -subklassen	32
3.2.5.2	Bestimmung der Spezifität monoklonaler Antikörper mittels Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)	33
3.2.5.3	Beeinflussung der Concanavalin A-induzierten Stimulation von PBMC durch monoklonale Antikörper	35
4	ERGEBNISSE	37
4.1	<u>Herstellung monoklonaler Antikörper</u>	37
4.1.1	Fusionsprotokolle	37
4.1.1.1	Fusionsansätze	38
4.1.1.2	Hybridomausbeute	40
4.1.1.3	Bezeichnung der Hybridome	41
4.1.1.4	Fusionsfrequenzen	41
4.1.2	Screeningergebnisse	42
4.1.2.1	Ergebnisse der 1. Selektionsstufe	42
4.1.2.2	Ergebnisse der 2. Selektionsstufe	44
4.1.2.2.1	Ergebnisse der Versuchsreihe A	45
4.1.2.2.2	Ergebnisse der Versuchsreihe B	47
4.1.3	Vergleich der Immunisationsschemata	53
4.1.4	Klonierungsergebnisse	55
4.1.5	Produktion von monoklonalen Antikörpern über Aszites	56

4.2	<u>Charakterisierung der monoklonalen Antikörper</u>	57
4.2.1	Bestimmung der Immunglobulinklassen und -subklassen	57
4.2.2	Bestimmung der Antikörpertiter	58
4.2.3	Bestimmung der Markierungsrate monoklonaler Antikörper an Bursa-, Milz- und Thymuszellen sowie PBMC mittels FACS-Analyse	60
4.2.4	Beeinflussung der Con A-induzierten Stimu- lation von PBMC durch monoklonale Antikörper	63
4.3	<u>Zusammensetzung von PBMC nach ihrer Isolation im Ficoll-Dichtegradienten</u>	65
5	DISKUSSION	67
6	ZUSAMMENFASSUNG	78
7	SUMMARY	80
8	LITERATURVERZEICHNIS	82

Abkürzungsverzeichnis:

BSA	=	Bovines Serumalbumin
Con A	=	Concanavalin A
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
ELISA	=	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCA	=	Freund's Complete Adjuvant
FCS	=	Fetales Kälberserum
FITC	=	Fluorescein-Iso-Thiocyanat
HAT	=	Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin
HGPRT	=	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HT	=	Hypoxanthin/Thymidin
Ig	=	Immunglobulin
IIF	=	Indirekte Immunofluoreszenz
kD	=	Kilodalton
mAb	=	Monoklonaler Antikörper
MG	=	Molekulargewicht
PBMC	=	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	=	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PEG	=	Polyethylen Glycol
RT	=	Raumtemperatur
TCR	=	T-Zell-Rezeptor

1 EINLEITUNG

Die seit 1965 am hiesigen Institut gezüchtete Hühnerlinie UM-B19 (BRÜGGEMANN et al., 1967) ist weiterhin Gegenstand intensiver immunologischer Studien.

Diese zum Formenkreis der kombinierten Immunodefizienzen gezählte, erbliche Dysgammaglobulinämie manifestiert sich in einem drastisch erniedrigten Serum IgG-Spiegel. Die Serumspiegel für IgA und IgM sind dabei gleichzeitig erhöht. Da diese Tiere grundsätzlich zur IgG-Synthese befähigt sind (LÖSCH et al., 1981), wird eine Dysregulation im Immunsystem, an der hauptsächlich T-Zell-Subpopulationen (T-Helferzellen; T-Suppressorzellen) beteiligt sind, diskutiert (KOHLMANN-RABENS et al., 1987).

Durch die Einführung der Hybridoma-Technik in die Biowissenschaften und Medizin durch KÖHLER und MILSTEIN (1975) ist man in der Lage, spezifische, molekular einheitliche, standardisierbare, nur gegen eine einzige Determinante gerichtete Nachweisreagenzien von gleichbleibender Spezifität herzustellen.

Durch ihre Anwendung erhält man nicht nur die Möglichkeit einzelne Zellpopulationen zu differenzieren, sondern auch funktionelle Studien an ihnen durchzuführen. So können durch monoklonale Antikörper spezifische Zellfunktionen sowohl stimuliert als auch inhibiert werden, wodurch man gezielt in Regelkreise eingreifen und diese studieren kann.

Ziel dieser Arbeit ist es, monoklonale Antikörper gegen T-Zell-Subpopulationen beim Haushuhn herzustellen. Sie sollen einerseits dazu beitragen, allgemeine Aspekte des T-Zell-Systems und der Immunregulation zu studieren, andererseits aber auch die Frage einer eventuell vorhandenen überschüssigen Suppressorzell-Aktivität, die als Mechanismus zur Dysgammaglobulinämie des Huhnes diskutiert wird, zu klären.



2 LITERATUROBERSICHT

2.1 Immunsystem

Das Immunsystem der Vertebraten besteht aus einer Anzahl verschiedener Organe und Zelltypen. Die im Laufe der Evolution entwickelten Abwehrmechanismen erreichen hier ihre größte Komplexität. Neben der unspezifischen, sind höhere Wirbeltiere auch grundsätzlich zur Antigen-spezifischen Immunantwort fähig.

Antigen-spezifische Immunreaktionen können sowohl humoraler als auch zellvermittelter Natur sein.

Beide Formen der spezifischen Immunabwehr können am Modell Haushuhn in idealer Weise studiert werden, da dieses über zwei, sowohl morphologisch als auch funktionell vollständig getrennte, primäre lymphatische Systeme (Bursa fabricii; Thymus) verfügt (COOPER et al., 1966).

Während die humorale Immunabwehr ihre zelluläre Grundlage in bursaabhängigen Zellen - B-Lymphozyten - besitzt, die lösliche Immunglobuline bilden und freisetzen, sind für die zellvermittelte Immunität thymusabhängige Zellen - T-Lymphozyten - verantwortlich.

Ihrer Funktion nach stellen T-Zellen eine heterogene Zellpopulation dar, die aufgrund vielfacher Wechselbeziehungen zum humoralen und zellvermittelten Immunsystem einerseits, zu unspezifischen Komponenten (Makrophagen, polymorphkernige Granulozyten) andererseits, eine entscheidende Rolle in der Immunantwort spielt.

Im Hinblick auf ihre funktionellen Eigenschaften unterscheidet man T-Helferzellen, T-Suppressorzellen und zytotoxische T-Lymphozyten (CANTOR und BOYSE, 1977), die aber bezüglich

ihres Phänotyps keineswegs einheitliche Zellpopulationen darstellen (BALLIEUX und HEIJNEN, 1983).

2.2 Möglichkeiten der Differenzierung einzelner Lymphozytenpopulationen

B- und T-Lymphozyten, sowie deren Subpopulationen lassen sich morphologisch nicht unterscheiden. Ihre Zellmembranen sind jedoch mit unterschiedlichen antigenen Strukturen ausgestattet, anhand derer sie differenziert und klassifiziert werden können.

Die Eigenschaft von Schafererythrozyten, mit einem Teil der Lymphozytenpopulation spontan Rosetten zu bilden, führte erstmals zur Entwicklung spezifischer Nachweissysteme für T-Lymphozyten (COOMBS et al. 1970). Spätere Untersuchungen mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern ergaben, daß der Rezeptor für Schafererythrozyten (T11-Antigen) ein Glykoprotein mit einem MG von 50 kD darstellt (TERHORST, 1984).

Durch den Nachweis von Fc-Rezeptoren mittels Hetero- (EVANS et al., 1977) bzw. Alloantiseren (REINHERZ et al., 1980) konnten zunächst bei Maus und Mensch verschiedene T-Zell-Subpopulationen charakterisiert werden.

Auch beim Huhn wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen mit Hilfe artspezifischer Hetero- (FORGET et al., 1970; McARTHUR et al., 1971; IVANYI und LYDYARD, 1972; HUDSON und ROITT, 1973; WICK et al., 1973; ISAKOVIC et al., 1975; SUGIMOTO et al., 1977; PINK et al., 1981; TRAILL et al. 1984) bzw. Alloantiseren (GILMOUR et al., 1976; GALTON und IVANYI, 1977; FREDERICKSEN et al., 1977; WAYTES et al., 1984; PEULT et al., 1982) verschiedene T-Zell-Subpopulationen beschrieben.

Entscheidende Fortschritte in der Charakterisierung immunkompetenter Zellen wurden aber erst durch die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen eine Vielfalt antigener Strukturen, wie Oberflächen-Immunglobuline, MHC Klasse I und II Moleküle, "Common Leucocyte" Antigene, CD3/TCR-Komplex und einer Reihe B- und T-Zell-spezifischer Differenzierungsantigene erzielt.

Mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen Thymuszell-spezifische Antigene konnte die T-Zell-Reifung im Thymus untersucht werden. Durch die Verfügbarkeit monoklonaler Antikörper gegen Differenzierungsantigene auf T-Lymphozyten konnten einzelne T-Zell-Subpopulationen funktionell charakterisiert, sowie die bei der Immunantwort ablaufenden zellulären Prozesse studiert werden (LEDBETTER et al., 1981).

2.3 T-Zell-Reifung

Ontogenetisch leiten sich sowohl B- als auch T-Lymphozyten von einer einzigen pluripotenten Stammzelle ab, die ihren Sitz im Knochenmark hat. Aus ihr differenzieren sich Prekursoren der lymphoiden Reihe, welche in die Bursa bzw. den Thymus einwandern und dort ihre Reifung erfahren.

Untersuchungen an Wachtel/Huhn Chimären erbrachten den Nachweis, daß hämatopoietische Stammzellen das Thymusepithel in zyklischen Wellen kolonisieren (JOTEREAU und Le DOUARIN, 1982).

Im Mikroenvironment des Thymus differenzieren sich Prothymozyten zu funktionell kompetenten T-Lymphozyten (MOORE und OWEN, 1967), was mit Veränderungen antigener Strukturen einhergeht (KONDA et al., 1973). Von hier aus wandern sie in das sekundäre lymphatische Gewebe ein.

Die T-Zell-Reifung wurde als erstes bei der Maus (CANTOR et al., 1976) untersucht. Sie kann anhand der unterschiedlichen Expression der L3T4-, bzw. Lyt-2-Antigene in 3 Stadien eingeteilt werden (v.BOEHMER, 1988; MacDONALD et al., 1988):

- Thymozyten der ersten Entwicklungsstufe exprimieren weder L3T4 noch Lyt-2, sind also "double negative".
- Thymozyten der zweiten Entwicklungsstufe sind "double positive", d.h. sie exprimieren sowohl L3T4- als auch Lyt-2-Antigene.
- Die dritte Stufe der T-Zell-Reifung wird durch die Auftrennung der L3T4⁺Lyt-2⁺ Population in die zwei, auch funktionell unterschiedlichen L3T4⁺Lyt-2⁻ (Helfer-Aktivität) und Lyt-2⁺L3T4⁻ (Suppressorzell- und zytotoxische Aktivität) Populationen gekennzeichnet.

Die Reifung menschlicher Thymuszellen gleicht im Wesentlichen der bei der Maus, jedoch mit der Ausnahme, daß das humane Homolog des TL-Antigens nicht auf peripheren T-Zellen exprimiert wird (REINHERZ und SCHLOSSMANN, 1980).

Auch beim Huhn wurden zum Studium der T-Zell-Ontogenese monoklonale Antikörper gegen Thymuszellen produziert und die von ihnen erkannten Antigene charakterisiert:

PEAULT et al. (1983) produzierten einen gegen Wachtelthymozyten gerichteten monoklonalen Antikörper (a-TD1), der ab dem 8. Tag der Embryonalentwicklung mit ca. 80 % kortikaler Thymozyten, jedoch nicht mit peripheren T-Zellen reagiert.

PINK und RIJNBEEK (1983) beschrieben einen gegen Hühnerthymozyten gerichteten monoklonalen Antikörper (X.14). Dieser präzipitiert Glykoproteine mit Molekulargewichten von 65 kD und 125 kD.

CHEN et al. (1984) produzierten 2 monoklonale Antikörper (CT-1; CT-1a), die gegen zwei verschiedene Epitope des glei-

chen Moleküls gerichtet sind. Sie präzipitieren Glykoproteine mit einem MG von 63 kD und 103 kD. Vom 12. bis 15. Tag der Embryonalentwicklung erhöht sich der Prozentsatz markierter Thymozyten von 6 % auf über 90 %, wohingegen nur 2-5 % Milz- bzw. reife T-Zellen und weniger als 0,05 % Bursazellen mit den Antikörpern reagieren. Während CT-1a nur Thymozyten des Huhnes erkennt, markiert CT-1 zugleich auch Wachtelthymozyten.

2.4 Differenzierungsantigene reifer T-Lymphozyten

In den letzten Jahren wurden mit Hilfe monoklonaler Antikörper einzelne Differenzierungsantigene peripherer T-Lymphozyten bei verschiedenen Säugetierspezies beschrieben. Die aviären Homologe dieser T-Zell-Marker wurden erst kürzlich beim Haushuhn identifiziert. Im Allgemeinen zeigen sie ein dem Säuger ähnliches Verteilungsmuster, was auf eine hohe phylogenetische Beständigkeit dieser antigenen Strukturen hinweist (CHAN et al., 1988).

2.4.1 CD3-Antigen

Das humane CD3-Antigen wird von allen peripheren T-Lymphozyten sowie von 30-60 % Thymuszellen exprimiert (LEDBETTER et al., 1981). Da monoklonale Antikörper, die sowohl gegen den CD3-Komplex als auch gegen den T-Zell-Rezeptor (TCR) gerichtet sind, zwei identische Polypeptidketten präzipitieren und zudem die gleichen T-Zell-Funktionen auslösen, wird eine non-kovalente Assoziation von CD3-Komplex und TCR angenommen. Das CD3-Antigen besteht aus 2 Glykoproteinen mit einem MG von 25 kD (γ -Kette) und 20 kD (δ -Kette), sowie einem Polypeptid mit einem MG von 20 kD (ϵ -Kette). Zusammen mit den TCR spielt der CD3-Komplex bei der Signalübertragung während der T-Zell-

Aktivierung eine wichtige Rolle (OETTGEN und TERHORST, 1987).

CHEN et al. (1986) erbrachten erste Hinweise auf das Vorliegen eines dem Säugetier homologen aviären CD3/TCR-Komplexes. Sie produzierten einen monoklonalen Antikörper (CT3) der in indirekter Immunofluoreszenz ca. 30 % Thymuszellen, 70 % periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) und 60 % Milzzellen markiert. Die biochemische Charakterisierung ergab 3 Polypeptidketten mit einem MG von 20 kD, 19 kD und 17 kD, von denen zwei N-glykosyliert sind. In Analogie zu den Verhältnissen beim Menschen, präzipitiert CT3 beim Huhn neben den 3 Polypeptidketten des CD3-Komplexes noch zusätzlich die α - und β -Kette des TCR.

2.4.2 CD4-Antigen

Das von menschlichen T-Zellen exprimierte CD4-Antigen ist ein Polypeptid mit einem MG von 50 - 60 kD (TERHORST et al., 1980). Es ist mit dem L3T4-Antigen der Maus vergleichbar (DIALYNAS et al., 1983) und wird von ca. 60 % peripheren T-Zellen, sowie 75 % Thymuszellen exprimiert (REINHERZ und SCHLOSSMANN, 1980). Zwei Farben Immunofluoreszenz zeigte, daß die meisten Thymozyten gleichzeitig CD4 und CD8 exprimieren, während reife T-Lymphozyten entweder CD4⁺CD8⁻ oder CD4⁻CD8⁺ sind. Das CD4-Antigen wird bei der Ratte zusätzlich noch von Makrophagen, beim Menschen von Monozyten exprimiert, wohingegen bei Maus und Huhn keine CD4-exprimierenden Monozyten nachgewiesen wurden. Desweiteren sind CD4⁺CD8⁻ Zellen für die Produktion von Interleukin 2 und anderer Helferfaktoren verantwortlich (MIEDEMA et al., 1985).

CHAN et al. (1988) produzierten beim Haushuhn einen monoklonalen Antikörper (CT4), der sowohl unter reduzierenden als auch nicht-reduzierenden Bedingungen ein Polypeptid mit einem MG von 64 kD präzipitiert. In indirekten Immunofluoreszenz-

tests markiert CT4 70 % Thymuszellen, 45 % PBMC, 10 % Milzzellen, jedoch weniger als 1 % Bursazellen. Desweiteren ist die CT4-reaktive Zellpopulation in erster Linie für die Produktion von Lymphokinen verantwortlich.

Diese Daten liefern den Hinweis, daß es sich bei der von CT4 erkannten Struktur um ein aviäres Homolog des menschlichen CD4-Antigens handelt.

2.4.3 CD8-Antigen

REINHERZ et al. (1979) beschrieben ein Differenzierungsantigen (CD8) auf humanen T-Zellen, das von 30 % peripheren T-Lymphozyten und 75 % Thymuszellen exprimiert wird. Dieses bei der Maus Lyt-2 benannte Antigen (JANDINSKI et al., 1976) kennzeichnet Zellen, die entweder zytotoxische Funktion oder Suppressorzell-Aktivität ausüben (CANTOR und BOYSE, 1975). Das humane CD8-Molekül ist ein über Disulfidbrücken verbundenes Heterodimer mit einem MG von je 34 kD (SNOW und TERHORST, 1983).

Beim Haushuhn produzierten CHAN et al. (1988) einen monoklonalen Antikörper (CT8), der das aviäre Homolog des CD8-Antigens markiert. In indirekter Immunofluoreszenz reagiert CT8 mit 80 % Thymuszellen, 50 % Milzzellen und 15 % PBMC. CT8 präzipitiert ebenfalls ein über Disulfidbrücken verbundenes Heterodimer, welches aus 2 Polypeptidketten mit einem MG von je 34 kD besteht.

2.5 T-Zell-Rezeptor

Mit Hilfe klonotypischer monoklonaler Antikörper wurde der T-Zell-Rezeptor (TCR) zunächst bei Mensch (MEUER et al., 1983) und Maus (HASKINS et al., 1983) beschrieben. Er dient als

Antigen-Rezeptor bei der MHC-restringierten Antigen-Erkennung.

Der TCR besteht aus einem Glykoprotein-Heterodimer mit einem MG von 80 - 90 kD, das aus zwei über Disulfidbrücken verbundenen Ketten (α ; β) mit einem MG von 38 - 50 kD aufgebaut ist. Jede Kette besteht aus einem konstanten und einem variablen Teil. Der TCR ist non-kovalent mit dem CD3-Komplex assoziiert (KAPPLER et al., 1983).

Neben dem α/β TCR wurde später noch ein weiterer TCR beschrieben, dessen Polypeptidketten sich von denen des α/β TCR unterscheiden und mit γ/δ bezeichnet werden (BRENNER et al., 1986).

Beide T-Zell-Rezeptoren wurden kürzlich auch beim Haushuhn beschrieben:

CIHAK et al. (1988) produzierten einen monoklonalen Antikörper (TCR2), der in indirekten Immunofluoreszenztests 50 % PBMC, 40 % Thymuszellen, 40 % Milzzellen, aber weniger als 1 % Bursazellen markiert.

Die von TCR2 erkannte Struktur stellt ein Heterodimer mit einem MG von 90 kD dar, welches aus zwei über Disulfidbrücken verbundenen Polypeptidketten mit einem MG von 40 kD und 50 kD aufgebaut ist (CHEN et al., 1988).

Dies und weitere funktionelle Eigenschaften legen den Schluß nahe, daß es sich bei dem von TCR2 erkannten Molekül um ein Homolog des Säuger α/β TCR handelt.

SOWDER et al. (1988) beschrieben einen weiteren monoklonalen Antikörper (TCR1), der dem aviären Homolog des Säuger γ/δ TCR entspricht. Dieser Antikörper reagiert mit 15 % PBMC, 10 % Thymuszellen, 25 % Milzzellen aber nicht mit Bursa- und Knochenmarkzellen.

Die biochemische Charakterisierung ergab zwei vom α/β TCR unterschiedliche Polypeptidketten, die aber gleichfalls mit dem CD3-Komplex assoziiert sind.

Ontogenetische Studien ergaben, daß TCR α/β und TCR γ/δ sowohl während der T-Zell-Reifung als auch auf reifen T-Lymphozyten von zwei unterschiedlichen T-Zell-Populationen exprimiert werden (CHEN et al., 1988).

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Regelmäßig verwendete Lösungen, Medien und Puffer

- Physiologische Kochsalzlösung

9,0 g NaCl

ad 1000,0 ml mit Aqua bidest. auffüllen

- PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)

8,0 g NaCl

0,2 g KCl

1,442 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

0,2 g KH_2PO_4

ad 1000,0 ml mit Aqua bidest. auffüllen

Eingestellt auf pH 7,4 mit 1N HCl

- PBS/Tween

0,5 ml Tween 20

(Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 7238701)

PBS pH 7,2 ad 1000,0 ml

- Fluoreszenzpuffer

2,0 ml FCS

(Fetales Kälberserum; Flow Lab., Irvine,
Schottland; Art.Nr.: 2910154)

0,02 g NaN_3

(Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 822335)

PBS pH 7,2 ad 100,0 ml

- PFA Puffer

5.0 g Paraformaldehyd auf 450,0 ml Aqua bidest. geben
(Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 4005)

1 Stunde bei 60°C im Wasserbad vollständig lösen
50,0 ml einer 10 x PBS Lösung zugeben

- RPMI 1640 Medium ohne Glutamin mit 2 g NaHCO₃

(Flow Lab., Irvine, Schottland; Art.Nr.: 12-602-54)

- Zellkulturwachstumsmedium

88,0 ml RPMI 1640

10,0 ml FCS

1,0 ml Penicillin/Streptomycin

(Fa. Biochrom, Berlin; Kat.Nr.: A 2212)

1,0 ml L-Glutamin

(Fa. Biochrom, Berlin; Kat.Nr.: KO 280)

- Selektionsmedium

76,0 ml RPMI 1640

20,0 ml FCS

1,0 ml Penicillin/Streptomycin

1,0 ml L-Glutamin

2,0 ml HAT (Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin)

(Flow Lab., Irvine, Schottland;

Art.Nr.: 16-808-49)

3.1.2 Kontrollantikörper

Folgende monoklonale Antikörper (mAb) wurden bei den verschiedenen Nachweissystemen als Kontrollantikörper eingesetzt:

- mAb6 (CIHAK et al., 1988)

Dieser mAb der Immunglobulinsubklasse IgG₁ markiert die α/β -Kette des T-Zell-Rezeptors, welche beim Haushuhn auf ca. 70 % der T-Zellen exprimiert wird.

Der Antikörper wurde entweder in Form von Zellkulturüberstand oder als 1:100 Verdünnung von Aszites verwendet.

- FT2 (KLOTZ und COOPER, 1986)

Ein monoklonaler Antikörper der Immunglobulinsubklasse IgG₁ reagiert spezifisch mit T-Zellen der Katze. In Form von Zellkulturüberstand wurde der Antikörper als Isotypkontrolle bei der Durchführung von FACS-Analysen eingesetzt.

Dieser Antikörper wurde freundlicherweise von Prof. M.D. Cooper, Tumor Institute, Birmingham, University of Alabama, USA, zur Verfügung gestellt.

- TEPC¹, ein von der Mäuse-Myelomzelllinie TEPC-183 produziertes Protein der Immunglobulinklasse IgM, wurde in einer Konzentration von 0,1 mg/ml als Isotypkontrolle bei der Durchführung der FACS-Analysen eingesetzt.

3.1.3 Tiermaterial

3.1.3.1 Mäuse

Bei der Herstellung monoklonaler Antikörper fanden 6-8 Wochen alte BALB/c² Mäuse beiderlei Geschlechts Verwendung. Die

¹ TEPC; Sigma Chemical Company, St.Louis, USA;
Kat.Nr.: M-1520

² Fa. Bomholtgard, Ry, Dänemark

Mäuse wurden unter gleichen Bedingungen in Gruppenkäfigen gehalten. Als Standarddiät diente handelsübliches Alleinfuttermittel (Altromin®) in pelletierter Form und Wasser ad libitum.

3.1.3.2 Hühner

- Nicht typisierte, immunologisch intakte Weisse Leghorn Hühner beiderlei Geschlechts dienten ab der 8. Lebenswoche als Spendertiere für Blutzellen.

- Als Spendertiere für Bursa-, Milz- und Thymuszellen fanden Hühner der gleichen Zuchtichtung in einem Alter von 4-8 Wochen Verwendung.

Die Tiere wurden in kleinen Gruppen auf Gitterrost gehalten. Handelsübliches Küken- bzw. Junghennenalleinfutter sowie Trinkwasser standen zur freien Aufnahme zur Verfügung.

3.1.3.3 "TCR3" exprimierende Hühner

Am Institut wurden Tiere entwickelt, die nach embryonaler und postnataler Injektion von gereinigten monoklonalen TCR2-Antikörpern eine Suppression der Expression des α/β T-Zellrezeptors aufweisen. Durch anschließende Thymektomie (PETERSON et al., 1964), wodurch die Reifung neuer T-Zellen im Thymus unterbunden wird, bleibt diese Suppression langfristig bestehen. Diese Tiere weisen T-Zellen auf, die weder TCR1⁺ noch TCR2⁺ sind. Solche Zellen exprimieren eine weitere TCR-Kette und werden als "TCR3"⁺ Zellen bezeichnet.

Bruteier von Weissen Leghorn Hühnern wurden hierzu durch Injektion von gereinigten monoklonalen TCR2-Antikörpern in die

Eihautvene am embryonalen Tag 14 (2 mg) und 18 (4 mg) behandelt. Am Tag 2 nach dem Schlupf wurden erneut 4 mg TCR2-Antikörper i.v. verabreicht. Am Tag 6 wurden die Tiere thymektomiert. Im Alter von 7 Wochen exprimierten T-Zellen dieser Tiere TCR1 zu 9 %, TCR2 zu 16 % und "TCR3" zu 75 %. T-Zellen unbehandelter Tiere exprimieren dagegen TCR1 zu 30 %, TCR2 zu 62 % und "TCR3" zu 8 % (CIHAK und LÖSCH, unveröffentlichte Ergebnisse).

Die Tiere wurden unter keimarmen Bedingungen in kleinen Gruppen auf Gitterrost gehalten. Die Diät bestand aus handelsüblichem Junghennenalleinfutter und Wasser ad libitum. Als Spendertiere für "TCR3" exprimierende T-Zellen fanden diese Tiere ab einem Alter von 8 Wochen Verwendung.

3.1.4 Zellmaterial

3.1.4.1 Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)

PBMC wurden nach der von BÖYUM (1968) beschriebenen Methode isoliert. Durch Punktion der V. cutanea ulnaris wurde den Hühnern unter aseptischen Bedingungen ca. 5 ml Blut entnommen. Die Entnahmeröhrchen enthielten 0,5 ml Liquemin 5000³ in einer Verdünnung von 1:20 in RPMI 1640 um die Blutgerinnung zu verhindern. Durch Zentrifugation im Ficoll-Dichtegradienten erfolgte die Separation der PBMC. Hierzu wurden in einem spitzen Zentrifugenröhrchen 10 ml Ficoll-Paque⁴ mit der gleichen Menge Blut (1:2 verdünnt in RPMI 1640) vorsichtig überschichtet und zentrifugiert⁵ (400 x g, 40 min., 18°C). Die

³ Liquemin 5000, Hoffmann-La Roche AG, Reg.Nr.: 47196

⁴ Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden; Art.Nr.: 170 840-03

⁵ Damon JEC Division, JEC PR-J Centrifuge

Interphase wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt, die Blutzellen durch Resuspendierung in 10 ml RPMI 1640 und anschließender Zentrifugation (10 min., 300 x g) gewaschen. Der Waschvorgang wurde 2 x wiederholt und die Zellen auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Aus 5 ml Blut ließen sich ca. $2-3 \times 10^8$ Zellen gewinnen.

3.1.4.2 Isolierung von Bursa- und Thymuszellen

Küken wurden durch zervikale Dislokation getötet, Bursa- sowie Thymuslappen entnommen und in vorbereitete Petrischalen⁶, die 10 ml RPMI 1640 enthielten, überführt und auf Eis gehalten. Mittels zweier Pinzetten wurden die Organe ca. 10 min. zerzupft und gequetscht. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen dekantiert und 10 min auf Eis gestellt, wodurch größere Zellverbände sedimentierten. Der Überstand, der eine Einzelzellsuspension darstellt, wurde abgehoben und zentrifugiert (300 x g, 10 min.). Das Pellet wurde 2 x gewaschen und die Zellzahl ermittelt. Eine Bursa ergab ca. $5-7 \times 10^8$, ein Thymuslappen ca. $3-5 \times 10^8$ Zellen.

3.1.4.3 Isolierung von Milzzellen

Einem getöteten Huhn wurde die Milz entnommen und entsprechend Punkt 3.1.4.2 eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden in 10 ml RPMI 1640 aufgenommen und durch Zentrifugation im Dichtegradienten aufgetrennt (Punkt 3.1.4.1). Die leukozytenhaltige Interphase wurde mit einer Pasteurpipette entnommen, 3 x mit je 10 ml RPMI 1640 gewa-

⁶ Pertischalen 60x15; Fa. Falcon; Art.Nr.: 3002

schen und die Zellzahl ermittelt. Aus einer Milz ließen sich ca. $2-4 \times 10^9$ Zellen isolieren.

3.1.4.4 Myelomzelllinie

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurde die permanente Myelomzelllinie X63-Ag8.653 verwendet (KEARNEY et al., 1979). Diese Zelllinie ist HAT-sensitiv, HGPRT-negativ und produziert selbst keine eigenen Immunglobulinketten mehr.

Die Zellen wurden freundlicherweise vom Institut für Tierpathologie der Universität München zur Verfügung gestellt.

Die Myelomzellen wurden mit Wachstumsmedium in 25 cm² Zellkulturflaschen⁷ in einem mit 5 % CO₂ begasten Brutschrank⁸ bei 37°C vermehrt. Die Kulturen wurden routinemäßig alle 3-4 Tage im Verhältnis von 1:10 bis 1:40 geteilt.

Sollten die Myelomzellen zur Fusion gebracht oder konserviert werden, mußten sie über den Zeitraum von einer Woche täglich im Verhältnis von 1:3 bis 1:4 geteilt werden. Hierdurch wurden die Zellen in die logarithmische Wachstumsphase gebracht.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellzählung

Die Anzahl lebender Zellen wurde nach Färbung mit Trypan-

⁷ Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark; Art.Nr.: 1-47589

⁸ CO₂-Auto-Zero; Heraeus GmbH, Hanau

blau⁹ bestimmt (NATT und HERRICK, 1952). Die jeweilige Zellsuspension wurde im Verhältnis von 1:2 mit Trypanblaulösung verdünnt und die Zellzahl durch Auszählen eines Leukozytenquadrates (mindestens jedoch von 100 Zellen) in der Zählkammer nach Neubauer¹⁰ bei 100-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop¹¹ bestimmt.

3.2.2 Anfertigung eines Zytozentrifugenpräparates

Im Anschluß an ihre Isolierung wurden PBMC auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Hierzu mußten die auf eine Dichte von 1×10^6 /ml in RPMI 1640 eingestellten Leukozyten vorerst mit der äquivalenten Menge BSA¹² Lösung (20 %ig in Aqua bidest.) vermischt werden, bevor damit entfettete Objektträger¹³, die auf speziellen Einsätzen einer Zytozentrifuge installiert waren, mit je 100 µl dieser Zubereitung beschickt wurden. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in der Zytozentrifuge¹⁴ (60 x g, 3 min.) auf den Objektträgern fixiert und getrocknet. Die Färbung der Präparate erfolgte in modifizierter Form nach Pappenheim und wurde entsprechend folgendem Schema durchgeführt:

- 3 Minuten mit konzentrierter, modifizierter May-Grünwalds¹⁵ Lösung bedecken und bei Raumtemperatur (RT) inkubieren

⁹ Fa. Serva, Heidelberg; Art.Nr.: 37252

¹⁰ Fa. Bender und Hobein, München; Art.Nr.: 9161078

¹¹ Laborlux 11; Fa. E.Leitz, Wetzlar

¹² Bovines Serumalbumin; Sigma Chemical Company, St.Louis, USA; Kat.Nr.: A-6793

¹³ Fa. Bender und Hobein, München; Art.Nr.: 9161110

¹⁴ Universal Zytozentrifuge; Fa. Hettich, Tuttlingen

¹⁵ Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 1424

- Farbstoff abkippen
- 12 Minuten mit Giemsa¹⁶ Lösung (1:10 in Aqua bidest. verdünnt) im Schüttelbad bei 37°C inkubieren
- Spülen mit Aqua bidest.

Die Auswertung erfolgte im Lichtmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl. Es wurden 200 Zellen ausgezählt und die einzelnen Zellpopulationen differenziert.

3.2.3 Herstellung monoklonaler Antikörper

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurde in dieser Arbeit das Maus-System herangezogen. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die einzelnen Schritte der Hybridomtechnik wieder.

3.2.3.1 Immunisierung der BALB/c Mäuse

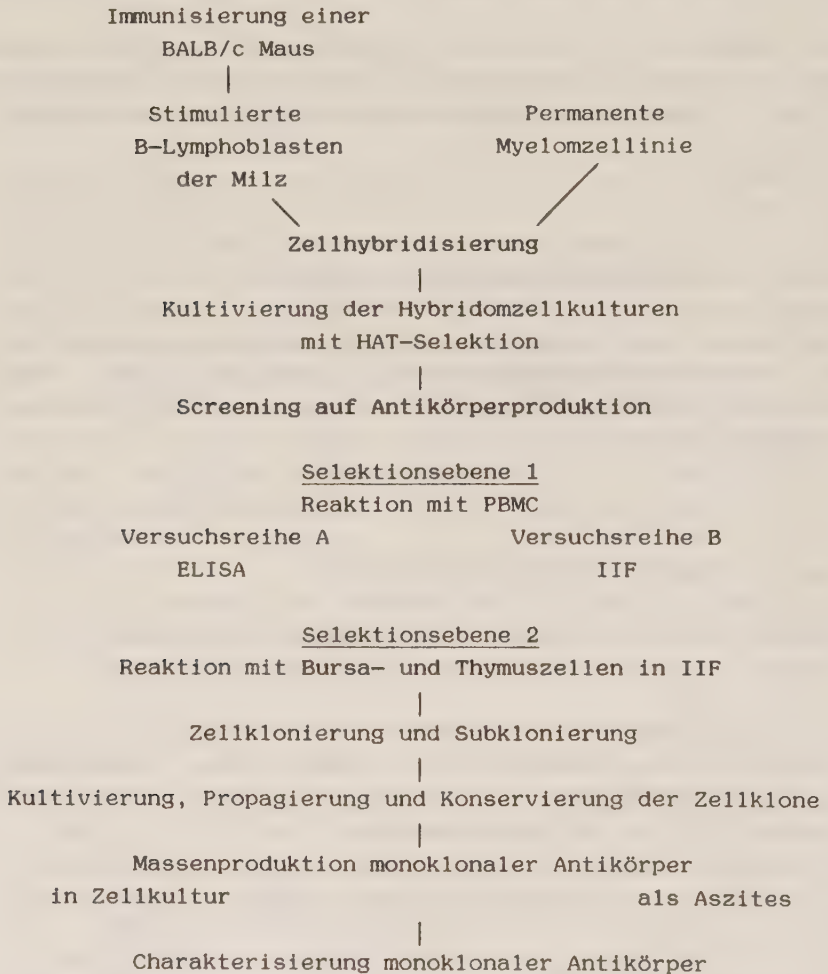
Weibliche, 8-12 Wochen alte BALB/c Mäuse wurden gemäß der in Tabelle 1 aufgeführten Schemata immunisiert.

Als Antigen dienten sowohl PBMC als auch Thymozyten (TZ). Pro Injektion wurden jeweils 2×10^7 intakte Zellen, suspendiert in 0,2 ml RPMI 1640, i.p. verabreicht. Der letzte Boost erfolgte i.v. in die Schwanzvene.

3 Tage nach dem letzten Boost wurden die Milzzellen gewonnen

¹⁶ Fa. Merck, Darmstadt; Art.Nr.: 9204

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Produktion monoklonaler Antikörper



und mit Myelomzellen zur Fusion gebracht.

In Versuchsreihe A wurden PBMC von Normotieren, in Versuchsreihe B von "TCR3" exprimierenden Hühnern verwendet.

Bei den Immunisationsprotokollen V und VI wurden die Zellen zur Grundimmunisation in Freund's Complete Adjuvant (FCA)¹⁷ im Verhältnis von 1:2 emulgiert und s.c. appliziert.

Tabelle 1: Darstellung der verschiedenen Immunisations-schemata

Protokoll Nr.:	I	II	III	IV	V	VI
Grundimmunisation mit:	PBMC	TZ	PBMC	TZ	PBMC/FCA	TZ/FCA
Anzahl der Auffrischungen im Abstand von 4 Wochen	1	1	3	3	1	1
Letzter Boost mit	PBMC	PBMC	PBMC	PBMC	PBMC	PBMC
Tage bis zur Fusion	3	3	3	3	3	3

¹⁷ Difco Laboratories, Detroit. USA; Best.Nr.: 0638-60-7

3.2.3.2 Zellfusion (KÖHLER und MILSTEIN, 1975)

Die Hybridisation von B-Lymphoblasten der Milz mit Myelomzellen wurde entsprechend der von PETERS et al. (1985) beschriebenen Methode vorgenommen.

Vorbereitung der Milzzellen: Eine immunisierte BALB/c Maus wurde durch zervikale Dislokation getötet, die Milz unter sterilen Bedingungen entnommen und in eine Petrischale, in der 10 ml RPMI 1640 vorgelegt waren, verbracht. Mittels zweier Pinzetten wurde die Milz zerzupft, so daß eine Einzellsuspension entstand. Diese wurde in ein Zentrifugenglas dekantiert und auf Eis gestellt, wo im Laufe von 5 min. gröbere Gewebeverbände sedimentierten. Der Überstand wurde in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt, zentrifugiert (300 x g, 10 min.) und durch anschließende Resuspension in 10 ml RPMI 1640 gewaschen. Der Waschvorgang wurde 1 x wiederholt und die Zellzahl bestimmt.

Aus einer Milz ließen sich 5×10^7 bis 1×10^8 stimulierte B-Lymphoblasten isolieren.

Vorbereitung der Myelomzellen: Myelomzellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden in einem spitzen Zentrifugenglas pelletiert (300 x g, 10 min.), 1 x in 10 ml RPMI 1640 gewaschen und gezählt.

Aus zwei 80 cm² fassenden Zellkulturflaschen^{1*} ließen sich 1 bis 2×10^7 Myelomzellen gewinnen.

Zellhybridisierung: Alle Arbeitsschritte wurden bei 37°C ausgeführt. Die vorbereiteten Myelom- und Milzzellen wurden im Verhältnis von 1:5 in einem 30 ml fassenden Rundbodenzentrifugenglas vermischt und sedimentiert (200 x g, 5 min.). Nach dem vollständigen Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet gelockert und 1,5 ml des Fusionsvermittlers

^{1*} Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark; Art.Nr.: 1-47589

Polyethylen Glycol (PEG 1500¹⁹) (PONTECORVO, 1975) tropfenweise unter ständigem Schütteln im Verlaufe einer Minute zugegeben. Nach einer Einwirkzeit von einer Minute wurde das PEG mit vorgewärmter PBS nach folgendem Schema ausverdünnt:

1 ml in 30 Sekunden
3 ml in 30 Sekunden
6 ml in 30 Sekunden
10 ml in 30 Sekunden

Die Zellen wurden durch anschließende Zentrifugation (500 x g, 5 min.) fusioniert. Nach einer Stabilisationszeit von 5 min. wurde der Überstand vollständig abgesaugt und das Zellsediment in Selektionsmedium (LITTLEFIELD, 1964) vorsichtig resuspendiert. Dabei wurden jeweils 10⁷ eingesetzte Milzzellen in 6,6 ml Selektionsmedium aufgenommen.

3.2.3.3 Kultivierung der Hybridomzellen:

In jede Kavität einer 96-Loch Zellkultur-Mikrowellplatte²⁰ wurden 100 µl der Zellsuspension ausgesät.

Am Tag 4 wurden weitere 100 µl Selektionsmedium hinzugefügt. In der Folgezeit mußte alle 3-4 Tage ein Mediumwechsel vorgenommen werden, wobei jeweils 100 µl verbrauchtes Medium abgenommen und durch ein Aliquot frischen Mediums ersetzt wurde. Ab dem 10. Tag nach der Fusion konnte der HAT-Anteil des Selektionsmediums durch Hypoxanthin/Thymidin (HT)²¹ ersetzt werden, da bis dahin alle nicht-fusionierten Myelomzellen abgestorben waren.

¹⁹ Fa. Boehringer, Mannheim; Art.Nr.: 783641

²⁰ Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark; Art.Nr.: 1-67008

²¹ Hypoxanthin/Thymidin; Flow Lab., Irvine, Schottland;
Kat.Nr.: 16-809-47

Nach weiteren 14 Tagen wurde auf normales Wachstumsmedium übergewechselt.

Die Kulturen wurden ab dem 5. Tag regelmäßig unter dem Phasenkontrastmikroskop²² bei 64-facher Vergrößerung auf Koloniewachstum untersucht.

Waren ca. 30 % einer Kavität bewachsen, konnten 50 µl Oberstand abgesaugt und auf ihren Antikörpergehalt hin untersucht werden. Dabei mußte darauf geachtet werden, daß der letzte Mediumwechsel nicht weniger als 2 Tage vorher stattfand, da sonst der Antikörpergehalt zu gering gewesen wäre.

3.2.3.4 Nachweis der gegen Hühnerlymphozyten gerichteten monoklonalen Antikörper

Ab dem 10. Tag nach der Fusion konnten die einzelnen Hybride in einem ersten Screening-Test auf ihre Antikörperproduktion gegen PBMC vom Huhn getestet werden.

In Versuchsreihe A wurde hierfür ein Zell-ELISA, in Versuchsreihe B ein indirekter Immunofluoreszenztest herangezogen.

3.2.3.4.1 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (ENGVALL and PERLMANN, 1971)

Der Nachweis wurde nach der von SUTER et al. (1980) beschriebenen Methode in modifizierter Form durchgeführt. Der Test arbeitet nach dem Prinzip eines indirekten, nicht-

²² Diavert; E. Leitz, Wetzlar

kompetitiven ELISA, bei dem das Antigen (Zellen) an eine feste Phase gebunden ist.

Plattenbeschichtung: Als Reaktionsgefäße dienten Polystyrolplatten mit 96 Kavitäten²³. Jede Kavität wurde mit 100 µl Poly-L-Lysin²⁴ Lösung (2 mg auf 100 ml PBS) beschichtet und für 30 min. bei RT inkubiert.

Die Platten wurden anschließend gut ausgeschlagen, mit jeweils 100 µl Zellsuspension (5×10^6 Zellen/ml PBS) je Kavität beschickt, kurz geschüttelt, zentrifugiert²⁵ (1250 x g, 5 min.) und die Flüssigkeit abgekippt.

Durch Zugabe von 100 µl eiskalter Glutaraldehyd²⁶ Lösung je Kavität (0,5 %ig, kurz vor Gebrauch aus 25 %iger Stammlösung in PBS hergestellt) und 15 minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen fixiert und anschließend 3 x mit PBS gewaschen.

Um noch vorhandene freie Bindungsstellen der Reaktionsplatten zu blockieren, wurden je Kavität 200 µl einer BSA/Glycin²⁷ Lösung (1 % BSA und 100 mMol/l Glycin in physiologischer NaCl) zugegeben und 1 Stunde bei RT inkubiert, bevor wiederum 3 x mit PBS gewaschen wurde.

Die so vorbereiteten Platten konnten in dieser Form zum Nachweis verwendet, oder nach 30 minütiger Inkubation bei RT mit jeweils 200 µl BSA Lösung (1 %ig in physiologischer NaCl) pro Kavität und abschließender Versiegelung mit Parafilm²⁸ bei -20°C konserviert werden.

Durchführung des ELISA: Nach dem Auftauen mußten die beschichteten Platten zunächst 3 x mit PBS/Tween gewaschen,

²³ Immuno-Plate II; Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark; Art.Nr.: 4-42404

²⁴ Sigma Chemical Company, St.Louis, USA; Kat.Nr.: P-2636

²⁵ TJ-6 Centrifuge; Beckman Instruments, München

²⁶ Sigma Chemical Company, St.Louis, USA; Kat.Nr.: G-6257

²⁷ Fa. Serva, Heidelberg; Art.Nr.: 23390

²⁸ American Can Company, Greenwich, CT, USA

sowie 50 µl PBS/Tween je Kavität vorgelegt werden.

Reihe I der Platte wurde mit 50 µl Wachstumsmedium je Kavität beschickt. Sie diente als Negativkontrolle und zum Justieren des Photometers.

Reihe II wurde als Positivkontrolle angesetzt, wozu in jede Kavität 50 µl Zellkulturüberstand von mAb6 einpipettiert wurden.

Die restlichen Kavitäten der Platte konnten mit jeweils 50 µl der zu testenden Hybridomkulturüberstände versehen werden. Die Platten wurden mit Parafilm versiegelt und 1 Stunde bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Es folgten 3 Waschzyklen mit PBS/Tween.

Im nächsten Schritt wurden je Kavität 100 µl Peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG+M²⁹ (1:250 in PBS verdünnt; im Vorversuch ermittelt) zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation von 45 min. bei 37°C unter leichtem Schütteln gefolgt von 3 Waschzyklen mit PBS/Tween.

Um die Reaktion sichtbar zu machen, wurden je Kavität 100 µl Substratlösung (Aminosalicylsäure³⁰, 0,16 %ig in Aqua bidest., mit 1N NaOH auf pH 6,0 eingestellt; kurz vor Gebrauch mit 0,5 %iger H₂O₂ im Verhältnis von 1:10 verdünnt) zugegeben.

Nach 10 min. konnte die Farbreaktion mit 50 µl 1N NaOH gestoppt und die Extinktion bei 492 nm im Photometer³¹ gemessen werden. Extinktionswerte > 0,1 wurden als positiv bewertet.

²⁹ Fa. Medac, Hamburg; Code Nr.: 6453

³⁰ Sigma Chemical Company, St.Louis, USA; Kat.Nr.: A-4283

³¹ Titertek Multiscan Elisa-Reader; Fa. Flow, Meckenheim

3.2.3.4.2 Indirekter Immunofluoreszenztest (IIF)

(COONS et al., 1941)

Mit Hilfe der IIF wurde sowohl der erste Screening-Test in Versuchsreihe B, sowie die zweite Selektionsstufe in der Herstellung monoklonaler Antikörper, die Bestimmung der Spezifität PBMC-positiver Hybridomkulturüberstände durchgeführt.

Um die große Anzahl der Proben beim Screening zu bewältigen, wurde die IIF nach der von BOUCHEIX et al. (1980) beschriebenen Methode durchgeführt. Dieses Nachweissystem erlaubt die Beurteilung der Reaktion monoklonaler Antikörper an einer einzelnen, intakten Zelle.

Durchführung der Zellfärbung: Die Isolierung der Zielzellen erfolgte gemäß der Punkte 3.1.4.1-3, wobei für den ersten Screening-Test PBMC und für die Bestimmung der Spezifität der jeweiligen monoklonalen Antikörper Bursa- sowie Thymuszellen verwendet wurden. Die Zellen wurden in eiskaltem Fluoreszenzpuffer auf eine Dichte von 5×10^7 /ml eingestellt und auf Eis gehalten. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 4°C ausgeführt.

Als Reaktionsgefäße dienten 96-Loch Rundboden-Mikrowellplatten³², in die je Kavität 20 µl der Zellsuspension zusammen mit je 50 µl der zu testenden Hybridomkulturüberstände einpipettiert wurden. Die Platten wurden gut geschüttelt und 30 min. auf dem Eisbad inkubiert.

Zusätzlich wurden folgende Kontrollen mitangesetzt:

- Positivkontrolle: Zellkulturüberstand von mAb6
- Konjugatkontrolle: Wachstumsmedium anstatt Zellkulturüberstand; Konjugat

³² Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark; Art.Nr.: 1-63320

Es folgten 3 Waschzyklen, wozu die Platten erst zentrifugiert (150 x g, 4 min.), die Überstände mit einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen abschließend mit je 100 µl Fluoreszenzpuffer resuspendiert wurden.

Im nächsten Schritt wurden je Kavität 50 µl FITC-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG+M³ in einer Verdünnung von 1:20 in Fluoreszenzpuffer (durch Vorversuch ermittelt) zugegeben, gut geschüttelt und erneut 30 min. auf dem Eisbad inkubiert.

Nach 3 weiteren Waschzyklen wurden die Proben in 20 µl PFA Puffer aufgenommen.

Auswertung der Präparate: 5 µl der Zellsuspension wurden auf einen Objektträger verbracht, mit einem Deckglas versehen und unter dem Fluoreszenzmikroskop^{3,4} bei 400-facher Vergrößerung betrachtet.

Während beim Screening-Test nur ein +/- Ergebnis interessierte, wurden bei der Bestimmung der Spezifität 200 Zellen ausgewertet und der Prozentsatz der markierten Zellen bestimmt.

3.2.3.5 Zellklonierung

Um ihre Antikörperproduktion stabil zu erhalten, müssen Hybridomkulturen möglichst frühzeitig in der Produktionsphase einem Klonierungsverfahren unterworfen werden. Damit wird sichergestellt, daß alle Zellen einer Kolonie von einer einzigen Elternzelle abstammen.

Als Methode der Wahl wurde die Endpunktverdünnungsmethode (GALFRE und MILSTEIN, 1981) herangezogen. Die einzelnen

^{3,3} Fa. Medac, Hamburg; Code Nr.: 6253

^{3,4} Laborlux K; E. Leitz, Wetzlar

Kulturen wurden solange kloniert, bis sie entsprechend einer Poisson-Verteilung mit einer Wahrscheinlichkeit von > 99 % als monoklonal angesehen werden konnten.

Herstellung eines "feeder layer": Zunächst mußten 96-Loch Zellkultur-Mikrowellplatten mit Feederzellen vorbereitet werden. Hierzu wurden je Kavität 100 µl syngene Milz- resp. Thymuszellen (2×10^6 /ml in Wachstumsmedium suspendiert) vorgelegt und über Nacht inkubiert. Die Platten waren bis zu einer Woche im Brutschrank haltbar.

Von jedem zu klonierenden Hybridom wurden in 10 ml Wachstumsmedium Zellsuspensionen in Konzentrationen von 3, 30 und 100 Zellen/ml hergestellt und je eine vorbereitete "feeder layer"- Platte davon mit je 100 µl/Kavität beschickt.

Nach möglichst erschütterungsfreier Inkubation wurden die Platten nach 1 Woche unter dem Phasenkontrastmikroskop auf Koloniewachstum untersucht und bei denjenigen Dellen, in denen nur eine Kolonie heranwuchs, ein Mediumwechsel vorgenommen.

Ab dem 10. Tag konnten die Klone entweder weiter expandiert und propagiert oder subkloniert werden. Nach jedem Klonierungsschritt wurden die Kolonien auf ihre Produktion von Antikörpern in indirekter Immunofluoreszenz getestet.

3.2.3.6 Kryokonservierung von Hybridomzellen

Hybridomzellen wurden in Anwesenheit von Dimethylsulfoxyd³⁵ (DMSO) eingefroren (ASHWOOD and SMITH, 1961).

Hierzu wurden die Kulturen in die logarithmische Wachstumsphase gebracht, die Zellen abzentrifugiert (300 x g, 10 min.)

³⁵ Fa. Serva, Heidelberg; Art.Nr.: 20385

und 1 x mit 10 ml RPMI 1640 gewaschen. Das Pellet wurde gelockert und je 5×10^6 Zellen in 1 ml eiskaltem Wachstumsmedium mit einem FCS-Anteil von 20 % resuspendiert. Anschließend wurde über den Zeitraum von 1 min. ein Aliquot eiskalten Einfriermediums tropfenweise unter leichtem Schütteln zugegeben.

– Einfriermedium:

58 % RPMI 1640
20 % FCS
20 % DMSO
1 % Penicillin / Streptomycin
1 % L-Glutamin

In Tiefgefrierampullen³⁶ portioniert und in einer Styroporbox verschlossen wurden die Zellen zunächst langsam bei -79°C eingefroren und nach 24 Stunden bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Auftauen der Zellen: Zum Auftauen der Zellen wurden die Ampullen bis zur Überschreitung des Gefrierpunkts bei 37°C auf dem Wasserbad gehalten. Die Zellsuspension wurde tropfenweise auf kaltes RPMI 1640 gegeben, suspendiert und abzentrifugiert ($300 \times g$, 10 min.). In 10 ml Wachstumsmedium aufgenommen konnten die Zellen in 5 Kavitäten einer 24-Loch Zellkulturplatte³⁷ ausgesät und in Kultur gebracht werden.

³⁶ Nunc Cryotube, 1,8 ml; Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark;
Art.Nr.: 3-63401

³⁷ Nunclon Multischale; Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark;
Art.Nr.: 143982

3.2.3.7 Massenproduktion monoklonaler Antikörper in vivo

Die Produktion monoklonaler Antikörper nach i.p. Implantation von Hybridomen in syngene Mäuse erfolgte nach der von BRODEUR (1984) beschriebenen Methode.

Zunächst mußten BALB/c Mäuse durch i.p. Applikation von je 0,5 ml 2,6,10,14 Tetramethylpentadecan (Pristan³⁸) vorbereitet werden (ANDERSON und POTTER, 1969). Nach 10 Tagen konnten den Mäusen jeweils 5×10^6 Hybridomzellen, suspendiert in 0,5 ml RPMI 1640, i.p. verabreicht werden.

Nach ca. 8-10 Tagen begannen die Mäuse Antikörper-haltigen Aszites zu bilden, der durch Punktion der Bauchhöhle gewonnen wurde. Jeder Maus konnte im Schnitt etwa 3-4 mal Aszites abgenommen werden.

Um zelluläre Anteile zu eliminieren, wurde der Aszites zunächst zentrifugiert (400 x g, 10 min.). Nach anschließender Ultrazentrifugation bei 100000 x g für 30 min. wurde der Aszites in Portionen abgefüllt und aufbewahrt.

3.2.4 Bestimmung der Titer monoklonaler Antikörper in den verwendeten Nachweissystemen

Bei der Herstellung monoklonaler Antikörper kommt der Erkennung Antikörper-produzierender Hybridomzellkulturen während des Screenings größte Bedeutung zu. Die herangezogenen Nachweissysteme wurden deshalb hinsichtlich ihrer Sensitivität untersucht.

Hierzu wurde der Titer ausgewählter Hybridomkulturen im Zell-ELISA und in IIF gegen PBMC getestet.

Von Zellkulturüberstand bzw. Aszites (1:100 in Fluoreszenz-

³⁸ Fa. Aldrich-Chemie, Steinheim; Kat.Nr.: T2,280-2

puffer vorverdünnt) wurde jeweils eine Verdünnungsreihe in logarithmischen Zweierschritten hergestellt und die Titer durch Endpunkttitration bestimmt. Als positiv wurde dabei im ELISA eine Extinktion $> 0,1$ bewertet, während in der IIF diejenige Verdünnungsstufe noch als positiv galt, die im Vergleich zur nächstfolgenden noch eindeutige Fluoreszenz zeigte.

3.2.5 Charakterisierung monoklonaler Antikörper

3.2.5.1 Bestimmung der Immunglobulinklassen und -subklassen

Die Bestimmung erfolgte mittels doppelter Immunodiffusion nach OUCHTERLONY (1962).

Zunächst mußten Agargel-Platten gegossen werden. Hierzu wurde Agar folgender Zusammensetzung auf dem Wasserbad bei 68°C verflüssigt:

1,0 g Agarose C³⁹
20,0 ml Tris-Barbiturat-Puffer
ad 100,0 mit Aqua bidest. auffüllen

Tris-Barbiturat-Puffer:

2,24 g Diäthylbarbitursäure
4,43 g Tris
0,0533 g Kalzium-Laktat
0,065 g Natriumazid
ad 100,0 ml mit Aqua bidest. auffüllen

pH 8,6 mit 1N HCl einstellen

³⁹ Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden; Art.Nr.:17-0424-02

Nach dem Erstarren wurden im Agar rosettenförmig angelegte Löcher ausgestanzt.

Von der zu analysierenden Probe (Zellkulturüberstand, durch Zentrifugation im Centrisart⁴⁰ auf das 10-fache konzentriert) wurden 8 µl in das Zentralloch einpipettiert.

Die äußeren Löcher wurden ebenfalls mit 8 µl der folgenden, gegen die jeweiligen Immunglobulinklassen und -subklassen der Maus gerichteten Antiseren beschickt:

- anti-IgG₁⁴¹
- anti-IgG_{2a}⁴²
- anti-IgG_{2b}⁴³
- anti-IgM⁴⁴

Die Ansätze wurden über Nacht in der feuchten Kammer bei RT inkubiert und die Präzipitationsmuster ausgewertet. Es wurde jeweils ein Doppelansatz durchgeführt.

3.2.5.2 Bestimmung der Spezifität monoklonaler Antikörper mittels Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)

Monoklonale Antikörper, die in IIF sowohl PBMC als auch Thymuszellen, nicht aber Bursazellen markierten, wurden mittels FACS-Analyse hinsichtlich ihrer Bindung an verschiedene Zellpopulationen untersucht.

Die jeweiligen Zielzellen, Bursa-, Milz-, und Thymuszellen sowie PBMC wurden gemäß der Abschnitte 3.1.4.1-3 isoliert und in Fluoreszenzpuffer auf eine Dichte von $2,5 \times 10^7$ Zellen/ml

⁴⁰ Fa. Sartorius, Göttingen; Kat.Nr.: 13249 E

⁴¹ Fa. Medac, Hamburg; Code Nr.: 2134

⁴² Fa. Medac, Hamburg; Code Nr.: 2135

⁴³ Fa. Medac, Hamburg; Code Nr.: 2136

⁴⁴ Fa. Medac, Hamburg; Code Nr.: 2138

eingestellt.

Färbung der Zellen: 50 µl dieser Zellsuspensionen wurden zusammen mit je 50 µl der zu untersuchenden monoklonalen Antikörper (Aszites; 1:100 in Fluoreszenzpuffer verdünnt) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vermischt und 30 min. im Eisbad inkubiert.

Für jede Zellpopulation wurden folgende Kontrollen mit angesetzt:

+ **Kontrolle:** Aszites von mAb6, 1:100 in Fluoreszenzpuffer verdünnt

Isotypkontrolle: Bei der Untersuchung von monoklonalen Antikörpern der Immunglobulinsubklasse IgG₁ wurde Zellkulturüberstand vom mAb FT2, bei monoklonalen Antikörpern der Immunglobulinklasse IgM wurde das Mäuse-Myelomprotein TEPC in einer Konzentration von 0,1 mg/ml eingesetzt.

Es folgten 3 Waschschrte: Zentrifugation bei 500 x g für 5 min., Absaugen des Oberstands mit einer Pasteurpipette und anschließende Resuspension in 1 ml Fluoreszenzpuffer. Nach dem letzten Waschschrte wurden je 50 µl FITC-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG+M in einer Verdünnung von 1:20 in Fluoreszenzpuffer zugegeben, gut resuspendiert und für weitere 30 min. im Eisbad inkubiert. Nach 3 weiteren Waschschrten wurden die Zellen durch Zugabe von je 300 µl PFA Puffer fixiert und die Markierungsrate im EPICS V - Cytofluorographen⁴⁵ bestimmt. Pro Ansatz wurden 20000 Zellen gemessen und die Fluoreszenzprofile ausgewertet.

⁴⁵ Coulter Electronics, Krefeld

3.2.5.3 Beeinflussung der Concanavalin A (Con A)-induzierten Stimulation von PBMC durch monoklonale Antikörper

Der Effekt monoklonaler Antikörper auf die Con A-induzierte Stimulation von PBMC wurde anhand der Inkorporation von [3 H]Thymidin durch die proliferierenden Zellen untersucht.

PBMC (Isolation siehe 3.1.4.1) wurden hierzu in Wachstumsmedium auf eine Dichte von 5×10^6 /ml eingestellt und 100 μ l davon pro Kavität einer 96-Loch Rundboden-Mikrowellplatte gegeben. Dazu wurden jeweils 100 μ l Con A⁴⁶ in einer Konzentration von 30 μ g/ml und 20 μ l Zellkulturüberstand (unverdünn, 1:4 sowie 1:16 in RPMI 1640 verdünnt) der zu untersuchenden Proben gegeben, gut geschüttelt und im Brutschrank bei 39°C und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Für jeden zu untersuchenden mAb wurden 3 Parallelansätze, sowie folgende Kontrollen mitangesetzt:

- Einbaukontrolle (Ek):
Zellen, kein Con A, kein mAb
- Stimulationskontrolle (Sk):
Zellen, Con A, kein mAb
- Inhibitionskontrolle:
Zellen, Con A, mAb6

Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit [3 H]Thymidin⁴⁷ markiert. Es wurde davon jeweils 1 μ Ci pro Zelle verbraucht und die Zellen nach einer Inkubation von 6 Stunden im Titerex Cell-Harvester geerntet, auf Glasfieberfilter gesammelt, getrocknet und in Szintillationsfläschchen gegeben. Nach Zugabe von je 10 ml Szintillationsflüssigkeit wurden die Proben im β -Counter⁴⁸ gemessen.

⁴⁶ Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden; Art.Nr. 17-6619-01

⁴⁷ Fa. Amersham Buchler, Braunschweig

⁴⁸ Packard Instruments, Frankfurt

Aus den Ergebnissen, als cpm (counts per minute) registriert, wurde zunächst das arithmetische Mittel ($\bar{x}$) und dann der Stimulationsindex (SI) errechnet.

$$SI = \frac{\text{cpm der Probe}}{\text{cpm Ek}}$$

4 ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit wurden monoklonale Antikörper gegen Oberflächenantigene von T-Lymphozyten beim Haushuhn produziert. Die experimentellen Arbeiten gliederten sich dabei in 2 große Abschnitte: In die Produktionsphase, in der die monoklonalen Antikörper gewonnen wurden und in die Phase ihrer Charakterisierung.

4.1 Herstellung monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper wurden durch Fusion von stimulierten B-Lymphoblasten der Milz und Zellen der permanenten Myelomzelllinie X63-Ag8.653 unter Verwendung von Polyethylen Glycol als Fusionsvermittler hergestellt.

In einer 1. Selektionsstufe wurden die Hybridomzellkulturüberstände auf Anwesenheit von Antikörpern gegen PBMC getestet. Alle positiven Reagenten wurden in einer 2. Selektionsstufe auf ihre Spezifität gegen Bursa- sowie Thymuszellen untersucht.

Diejenigen Hybridome, deren Antikörper nur mit PBMC und Thymuszellen, nicht aber mit Bursazellen reagierten, wurden kloniert, propagiert und konserviert. Durch intra-peritoneale Applikation von Hybridomzellen in vorbehandelte Mäuse wurden größere Mengen an monoklonalen Antikörpern produziert.

4.1.1 Fusionsprotokolle

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurden 2 Versuchsreihen mit insgesamt 33 Zellfusionen durchgeführt.

Die Ergebnisse werden in Tabelle 2 zusammenfassend dargestellt.

Die Fusionsprotokolle der Versuchreihe A unterscheiden sich hinsichtlich des in der 1. Selektionsstufe verwendeten Nachweissystems von denen der Versuchsreihe B.

Tabelle 2: Zusammenfassung der einzelnen Zellfusionen

	Versuchs- reihe A	Versuchs- reihe B	Gesamt
Zahl der Fusionen	20	13	33
Fusionen mit Hybridomwachstum	19	13	32
Plattenvertiefungen angesetzt	10220	5824	16044
Plattenvertiefungen mit Hybridom- wachstum	2634	2026	4660

4.1.1.1 Fusionsansätze

In Versuchsreihe A wurden 20 (A1 bis A20) und in Versuchsreihe B 13 (B1 bis B13) Zellfusionen durchgeführt. Dabei wurden insgesamt 16044 Plattenvertiefungen (10220 in Versuchsreihe A und 5824 in Versuchsreihe B) angesetzt.

Mit Ausnahme von Fusion A12, die kein Hybridomwachstum zeigte, waren alle Zellfusionen erfolgreich.

Tabelle 3: Hybridomausbeute der einzelnen Zellfusionen aus Versuchsreihe A

Fusion Nr.:	Platten- vertiefungen	Plattenvertiefungen mit Koloniewachstum		Fusions- frequenz
	ange- setzt	absolut	in %	
A1	312	139	44,55 %	$1:2,16 \times 10^5$
A2	376	257	68,35 %	$1:1,75 \times 10^5$
A3	336	179	53,27 %	$1:2,23 \times 10^5$
A4	916	169	18,41 %	$1:8,28 \times 10^5$
A5	672	227	33,78 %	$1:4,41 \times 10^5$
A6	848	142	16,75 %	$1:8,45 \times 10^5$
A7	480	87	18,13 %	$1:8,62 \times 10^5$
A8	576	96	16,66 %	$1:9,37 \times 10^5$
A9	192	104	54,17 %	$1:2,40 \times 10^5$
A10	288	204	70,83 %	$1:4,90 \times 10^4$
A11	440	33	7,50 %	$1:2,12 \times 10^6$
A12	264	—	—	—
A13	544	203	37,32 %	$1:3,94 \times 10^5$
A14	648	155	23,92 %	$1:6,45 \times 10^5$
A15	544	95	17,46 %	$1:8,42 \times 10^5$
A16	480	121	25,21 %	$1:5,79 \times 10^5$
A17	576	44	7,59 %	$1:2,05 \times 10^6$
A18	576	149	25,73 %	$1:6,71 \times 10^5$
A19	576	158	27,29 %	$1:6,33 \times 10^5$
A20	576	72	12,50 %	$1:1,39 \times 10^6$
Gesamt	10220	2634		

4.1.1.2 Hybridomausbeute

Von 16044 angesetzten Plattenvertiefungen wurden insgesamt 4660 (29,05 %) Hybridomkulturen isoliert.

Wie aus den Tabellen 3 und 4 hervorgeht, war die Ausbeute an Hybridomen bei den einzelnen Zellfusionen sehr unterschiedlich.

Tabelle 4: Hybridomausbeute der einzelnen Zellfusionen aus Versuchsreihe B

Fusion Nr.:	Platten- vertiefungen	Plattenvertiefungen mit Koloniewachstum		Fusions- frequenz
	ange- setzt	absolut	in %	
B1	456	87	19,08 %	$1:8,04 \times 10^5$
B2	480	76	15,83 %	$1:1,05 \times 10^5$
B3	280	77	27,50 %	$1:5,71 \times 10^5$
B4	480	69	14,38 %	$1:1,15 \times 10^6$
B5	288	130	45,14 %	$1:3,85 \times 10^5$
B6	576	67	11,63 %	$1:1,70 \times 10^6$
B7	480	288	60,00 %	$1:3,51 \times 10^5$
B8	480	244	50,83 %	$1:4,10 \times 10^5$
B9	576	208	36,11 %	$1:4,81 \times 10^5$
B10	480	288	60,00 %	$1:2,60 \times 10^5$
B11	480	322	67,08 %	$1:2,33 \times 10^5$
B12	384	66	17,19 %	$1:9,09 \times 10^5$
B13	384	104	27,08 %	$1:5,76 \times 10^5$
Gesamt	5824	2026		

Aus Versuchsreihe A gingen 2634 und aus Versuchsreihe B 2026 Kulturen hervor (Zusammenfassung siehe Tabelle 2).

Nach Zellfusionen aufgegliedert, bewegte sich die Ausbeute an Hybridomkulturen in Versuchsreihe A im Bereich von 7,50 % bis 70,83 % und in Versuchsreihe B von 11,63 % bis 67,08 % der angesetzten Plattenvertiefungen.

4.1.1.3 Bezeichnung der Hybridome

Damit die einzelnen Hybridomzellkulturen bzw. die von ihnen produzierten monoklonalen Antikörper jederzeit wieder ihrer Ursprungskolonie zugeordnet werden können, wurden sie nach einem einheitlichen System benannt.

Ihre Arbeitsbezeichnung setzt sich folgendermaßen zusammen: Die entsprechende Zellfusion wird durch einen großen arabischen Buchstaben für die Versuchsreihe sowie der laufenden Nummer angegeben. Es folgt eine römische Ziffer für die jeweilige Ausgangsplatte sowie die Bezeichnung der Plattenvertiefung, aus der die Kultur stammt.

4.1.1.4 Fusionsfrequenzen

Die Fusionsfrequenz, ein Maß für die Qualität des Fusionsansatzes, besagt aus wieviel eingesetzten Milzzellen eine Hybridomzelle hervorgegangen ist. Wie den Tabellen 2 und 3 zu entnehmen ist, bewegen sich die Fusionsfrequenzen der durchgeführten Zellfusionen im Bereich von $1:2,12 \times 10^6$ bis $1:4,90 \times 10^4$.

4.1.2 Screeningergebnisse

Die Selektion Antikörper-produzierender Hybridome wurde in 2 Schritten vorgenommen.

In der 1. Selektionsstufe wurden die Hybridomzellkulturüberstände auf ihre Reaktivität gegen PBMC getestet, wobei zunächst nur ein +/- Ergebnis interessierte.

In der 2. Selektionsstufe wurde die Bindungsfähigkeit aller positiven Reagenten an Bursa- und Thymuszellen untersucht. Hierbei wurde die prozentuale Markierungsrate dokumentiert.

4.1.2.1 Ergebnisse der 1. Selektionsstufe

In der 1. Selektionsstufe wurden insgesamt 4660 Hybridomzellkulturen auf ihre Produktion von monoklonalen Antikörpern gegen PBMC getestet.

Als Nachweissystem wurde in Versuchreihe A ein Zell-ELISA, in Versuchreihe B ein indirekter Immunofluoreszenztest herangezogen.

Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, konnten insgesamt 294 PBMC-positive Hybridomzellkulturen isoliert werden. 98 Kulturen stammten aus Versuchsreihe A, 196 aus Versuchsreihe B.

Tabelle 5: PBMC⁺ Hybridomkulturen der 1. Selektionsstufe

	Versuchs- reihe A	Versuchs- reihe B	Gesamt
PBMC ⁺ Hybridom- kulturen	98	196	294

Tabelle 6: Zusammenfassung der aus der 1. Selektionsstufe in Versuchsreihe A hervorgegangenen PBMC⁺ Hybridomkulturen und ihrer Spezifität gegenüber Bursa- und Thymuszellen

Fusion Nr.:	Selektionsstufe 1	Selektionsstufe 2			keine Reak- tion
	Anzahl der PBMC ⁺ Hybridomkulturen im ELISA	Spezifität gegenüber		Bursa-/ Thymus- zellen	
		Bursa- zellen	Thymus- zellen		
A1	3	-	-	2	1
A2	14	-	-	6	8
A3	4	-	-	3	1
A4	4	1	-	2	1
A5	7	1	-	2	4
A6	5	-	-	1	4
A7	4	-	-	1	3
A8	-	-	-	-	-
A9	4	-	-	1	3
A10	12	-	1	5	6
A11	-	-	-	-	-
A13	3	-	-	-	3
A14	5	-	-	1	4
A15	4	-	-	1	3
A16	8	1	-	1	6
A17	6	-	-	-	6
A18	4	-	-	-	4
A19	5	-	-	-	5
A20	6	-	-	-	6
Gesamt	98	3	1	26	68

Tabelle 7: Zusammenfassung der aus der 1. Selektionsstufe in Versuchsreihe B hervorgegangenen PBMC⁺ Hybridomkulturen und ihrer Spezifität gegenüber Bursa- und Thymuszellen

Fusion Nr.:	Selektionsstufe 1	Selektionsstufe 2			
	Anzahl der PBMC ⁺ Hybridomkulturen in IIF	Spezifität gegenüber			keine Reak- tion
		Bursa- zellen	Thymus- zellen	Bursa-/ Thymus- zellen	
B1	2	2	-	-	-
B2	2	-	-	2	-
B3	1	-	-	1	-
B4	2	-	-	-	2
B5	2	-	-	1	1
B7	28	9	-	14	5
B8	78	15	1	41	21
B9	14	5	-	7	2
B10	21	4	-	13	4
B11	27	10	-	12	5
B12	4	2	-	1	1
B13	15	2	-	7	6
Gesamt	196	49	1	99	47

4.1.2.2 Ergebnisse der 2. Selektionsstufe

Die aus der 1. Selektionsstufe hervorgegangenen 294 PBMC-positiven Hybridomzellkulturen wurden in einem indirekten

Immunofluoreszenztest auf ihre Bindungsfähigkeit an Bursa- sowie Thymuszellen untersucht.

Insgesamt 179 (60,54 %) Kulturen markierten Bursa- und/oder Thymuszellen, wobei 2 Hybridome nur mit Thymuszellen, 52 nur mit Bursazellen und 125 mit beiden Zellpopulationen reagierten.

Die Tabellen 6 und 7 geben die Verhältnisse der einzelnen Zellfusionen wieder.

4.1.2.2.1 Ergebnisse der Versuchsreihe A

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich ist, reagieren in IIF lediglich 30 (30,61 %) der 98 PBMC-positiven Hybridomzellkulturen mit Bursa- und/oder Thymuszellen. Diese stammen aus 12 der 19 Fusionen. Aus 7 Fusionen wurden keine Antikörper-produzierende Hybridomzellkulturen isoliert.

Die Markierungsraten der einzelnen Hybridome werden in Tabelle 8 detailliert aufgeführt.

Tabelle 8: Reaktionsmuster der aus Versuchsreihe A gewonnenen monoklonalen Antikörper mit PBMC, Bursa- und Thymuszellen in indirekter Immunofluoreszenz

Zeichenerklärung:

- : keine Fluoreszenz
 - + : 1-25 % fluoreszierende Zellen
 - ++ : 26-50 % fluoreszierende Zellen
 - +++ : 51-75 % fluoreszierende Zellen
 - ++++ : 76-100 % fluoreszierende Zellen
-

1fd.Nr.: Hybridom		Reaktion mit		
		PBMC	Bursazellen	Thymuszellen
1	A1 I G1	++	+	++
2	A1 III B11	+	++++	++
3	A2 II D1	+	+	+
4	A2 II F3	+++	+	+
5	A2 IV A11	+	+	+
6	A2 IV B2	++++	++++	++++
7	A2 IV G4	+	++	+
8	A2 IV G8	++	+	+
9	A3 IV A2	+	+	+
10	A3 IV A3	+++	+++	++
11	A3 IV A7	++	++++	+
12	A4 IX A1	+	++++	-
13	A4 IX D11	+	+	+
14	A5 II H10	++	+	+++
15	A5 III G4	++	+	+
16	A5 IV G12	+	+++	-
17	A6 V G3	+	+	+
18	A7 III E1	+	+	+
19	A9 II B3	++	++	+
20	A10 I A8	++	++	+
21	A10 I A9	++++	++++	++++
22	A10 I F6	++++	++++	+++
23	A10 III E7	+++	-	++++
24	A10 III E9	+	+	+
25	A10 III F12	+	+	+
26	A14 II E11	+	+	+
27	A15 VI A8	+++	++++	++
28	A16 I A8	+	+++	-
29	A16 IV D5	+	++	+

Von den 98 untersuchten Hybridomkulturüberständen reagierten nur 3 mit Bursa- und ein Kulturüberstand (A10 III E7) nur mit Thymuszellen. 26 weitere Hybridome markierten sowohl Bursa- als auch Thymuszellen. 68 Kulturen (69,39 %) zeigten keine Fluoreszenz.

4.1.2.2.2 Ergebnisse der Versuchsreihe B

Von den 196 PBMC-positiven Hybridomkulturen der Versuchsreihe B markierten 149 (76,02 %) Bursa- und/oder Thymuszellen (siehe Tabelle 7).

49 Kulturen reagierten nur mit Bursa-, eine Hybridomkultur (B8 III H3) nur mit Thymuszellen. Weitere 99 Hybridomzellkulturen reagierten sowohl mit Bursa- als auch mit Thymuszellen. 47 Kulturen (23,98 %) zeigten keine Fluoreszenz.

Die Markierungsraten der einzelnen Hybridome aus Versuchsreihe B werden in Tabelle 9 detailliert aufgeführt.

4 weitere Hybridomzellkulturüberstände markierten Oberflächenstrukturen auf Erythrozyten.

Zeichenerklärung:

- : keine Fluoreszenz
 - + : 1-25 % fluoreszierende Zellen
 - ++ : 26-50 % fluoreszierende Zellen
 - +++ : 51-75 % fluoreszierende Zellen
 - ++++ : 76-100 % fluoreszierende Zellen
-

Tabelle 9: Reaktionsmuster der aus Versuchsreihe B gewonnenen monoklonalen Antikörper mit PBMC, Bursa- und Thymuszellen in indirekter Immunofluoreszenz

1fd.Nr.: Hybridom		Reaktion mit		
		PBMC	Bursazellen	Thymuszellen
1	B1 I A4	+	++	-
2	B1 I D3	++	++++	-
3	B2 III H8	++++	++++	++++
4	B2 V D5	+	++++	+
5	B3 II C2	+	+	+
6	B5 II B5	++++	++++	++++
7	B7 I A5	+	+	-
8	B7 I D7	++++	++++	+++
9	B7 I F9	+	++	-
10	B7 II A3	+++	++++	-
11	B7 II A5	+	+	-
12	B7 II A11	+	++	-
13	B7 II B11	++++	+++	++++
14	B7 II C5	+	+	-
15	B7 II D9	+++	+++	++++
16	B7 II E2	+++	++++	-
17	B7 II H9	++++	++++	++++
18	B7 III A5	++	+++	-
19	B7 III C9	+++	++++	++++
20	B7 III D3	++++	++++	+++
21	B7 III E10	++	+++	+
22	B7 IV B6	+++	+	++++
23	B7 IV B7	++++	++++	++++
24	B7 IV C12	++++	++++	+++
25	B7 IV D5	+	++	+
26	B7 IV G7	+++	++++	++
27	B7 V D6	+++	++++	++++

Fortsetzung Tabelle 9:

1fd.Nr.: Hybridom		Reaktion mit		
		PBMC	Bursazellen	Thymuszellen
28	B7 V E10	+++	++++	-
29	B7 V G5	++++	++++	++++
30	B8 I A12	+	+	-
31	B8 I B8	++++	++++	++++
32	B8 I B10	+	++	-
33	B8 I B11	+	++	++
34	B8 I C1	+	+	+
35	B8 I C3	++++	+++	++++
36	B8 I C7	++	++	++
37	B8 I C8	+	+	+
38	B8 I C9	+	++	+
39	B8 I D3	+++	++++	++++
40	B8 I E6	+	++	-
41	B8 I E11	++	++++	+
42	B8 I E12	+	++++	-
43	B8 I F6	+	++++	-
44	B8 I F11	+	++	+
45	B8 I G12	+	+++	-
46	B8 I H3	++	++++	+
47	B8 I H4	+	+	++
48	B8 I H5	+++	++	++
49	B8 II A7	+	++++	+
50	B8 II B7	+	++++	-
51	B8 II B11	++	+	+
52	B8 II D2	+	+	-
53	B8 II D6	+	+++	-
54	B8 II D12	+	++	+
55	B8 II E1	+++	++	++
56	B8 II F1	+	++	+
57	B8 II F12	+	++	+

Fortsetzung Tabelle 9:

1fd.Nr.: Hybridom		Reaktion mit		
		PBMC	Bursazellen	Thymuszellen
58	B8 II G4	+++	++	+++
59	B8 II H2	+	+	+
60	B8 III A1	+	+++	-
61	B8 III A4	++++	++++	++++
62	B8 III B9	+	+++	+
63	B8 III C5	++++	++++	++++
64	B8 III C6	+	+	+
65	B8 III C7	++++	++++	++++
66	B8 III D1	+++	++++	++++
67	B8 III E2	+	+	+
68	B8 III G5	+	+	+
69	B8 III H1	+	+	-
70	B8 III H3	+	-	++++
71	B8 IV A3	++	++	+
72	B8 IV B12	++	++	+
73	B8 IV C12	++	+	+
74	B8 IV E9	+++	++++	++
75	B8 IV E10	+++	++++	+++
76	B8 IV F10	+	+++	-
77	B8 IV H1	+	++	-
78	B8 IV H2	+	+++	-
79	B8 V A4	++++	++++	++++
80	B8 V A12	++++	++++	-
81	B8 V B3	+	++	+
82	B8 V B4	+	++	+
83	B8 V D4	++++	++++	++++
84	B8 V C7	+	+	++
85	B8 V E9	+	+	+
86	B8 V E10	+	++	+
87	B9 I C11	+	+	-

Fortsetzung Tabelle 9:

1fd.Nr.: Hybridom		Reaktion mit		
		PBMC	Bursazellen	Thymuszellen
88	B9 II A8	+	++	-
89	B9 II H10	+	++	++
90	B9 III A10	+	++++	-
91	B9 III C6	++	++++	+
92	B9 IV E9	+	++	-
93	B9 IV F6	++	++++	+
94	B9 IV G8	+	+	+
95	B9 VI A4	++	++++	-
96	B9 VI B8	+	+	+
97	B9 VI C1	++++	++++	++++
98	B9 VI C2	++++	+++	++++
99	B10 I A3	++	++++	+
100	B10 I C11	+	++	-
101	B10 I F11	+	+	+++
102	B10 II A10	+	+	++
103	B10 II A11	+	+	+
104	B10 II D12	++	++	+
105	B10 II C12	+	+	-
106	B10 II F8	+	+	-
107	B10 II H6	+	+	+
108	B10 III D3	+	++	-
109	B10 III D9	+	+	+
110	B10 III F4	+++	+++	+
111	B10 III G8	++++	++++	+++
112	B10 IV A6	+	++	+
113	B10 IV E11	++	++	+
114	B10 IV F7	+++	++++	++++
115	B10 V F9	++++	+++	++++
116	B11 I A2	+	++	+
117	B11 I A6	++++	++++	++++

Fortsetzung Tabelle 9:

lfd.Nr.:	Hybridom	Reaktion mit		
		PBMC	Bursazellen	Thymuszellen
118	B11 I G3	+	++++	+
119	B11 I G5	++++	++	++++
120	B11 I H6	+	+	+
121	B11 II B5	+	+	-
122	B11 II B11	+++	++	++
123	B11 II C11	++++	++++	++++
124	B11 II D3	++++	++++	++++
125	B11 II E1	+++	+	++
126	B11 II H12	+	++	-
127	B11 II A5	+	++	-
128	B11 III C3	+	++	-
129	B11 III C9	+	+	-
130	B11 III D3	+	+	-
131	B11 IV A5	+	+	-
132	B11 IV B1	+	+	+
133	B11 IV E7	+	+	-
134	B11 IV F9	++	+	+
135	B11 V A4	++	+	+
136	B11 V B11	+	++	-
137	B11 V F10	+	++++	-
138	B12 I D4	++	++++	-
139	B12 IV D7	+	+	+
140	B12 IV H12	+	+	-
141	B13 I C9	+	+	+
142	B13 I D5	++++	++++	++++
143	B13 I E8	++	+	++++
144	B13 II H3	++++	++++	++++
145	B13 II H4	+	++++	-
146	B13 III H6	++	+++	+
147	B13 IV A9	+	+	-

Fortsetzung Tabelle 9:

1fd.Nr.: Hybridom		Reaktion mit		
		PBMC	Bursazellen	Thymuszellen
148	B13 IV A12	++++	++++	++++
149	B13 IV H1	++	+	+

4.1.3 Vergleich der Immunisationsschemata

Zur Immunisierung der BALB/c Mäuse wurden verschiedene Immunisationsschemata (siehe Punkt 3.2.3.1) angewandt. Ihr Einfluß auf die Ausbeute an Hybridomzellkulturen, die in indirekter Immunofluoreszenz nachweisbare Antikörper gegen Lymphozyten vom Huhn produzieren, wurde untersucht.

Als Parameter wurde der prozentuale Anteil Antikörper-produzierender Hybridome aus allen Plattenvertiefungen mit Koloniewachstum bestimmt (STÄHLI et al., 1980).

Die Immunisationsschemata V und VI zeichnen sich hierbei durch eine allgemein höhere Ausbeute an Antikörper-produzierenden Hybridomen aus (5,90 - 23,36 %), als die Immunisationsprotokolle I - IV (0 - 4,55 %). Als Ausnahme muß Fusion B7 erwähnt werden, wo nach Immunisation mit Schema III 10,08 % aller Hybridomkulturen Antikörper sezernierten.

Detaillierte Informationen zu den einzelnen Zellfusionen sind den Tabellen 10 und 11 zu entnehmen.

Tabelle 10: Ausbeute Antikörper-produzierender Hybridomkulturen in Abhängigkeit vom Immunisationsschema aus Versuchsreihe A

Fusion Nr.:	Immunisations- schema	Antikörper-produzierende
		Hybridomkulturen bezogen auf Plattenvertiefungen mit Koloniewachstum (in %)
A1	IV	1,44 %
A2	IV	2,33 %
A3	I	1,68 %
A4	IV	1,78 %
A5	IV	3,32 %
A6	III	0,70 %
A7	II	1,15 %
A8	IV	—
A9	IV	0,96 %
A10	III	2,94 %
A11	III	—
A12	III	—
A13	III	—
A14	III	0,65 %
A15	IV	1,05 %
A16	III	1,66 %
A17	III	—
A18	IV	—
A19	IV	—
A20	IV	—

Tabelle 11: Ausbeute Antikörper-produzierender Hybridomkulturen in Abhängigkeit vom Immunisationsschema aus Versuchsreihe B

Fusion Nr.:	Immunisations- schema	Antikörper-produzierende Hybridomkulturen
		bezogen auf Plattenvertiefungen mit Koloniewachstum (in %)
B1	I	2,30 %
B2	I	2,63 %
B3	I	1,30 %
B4	I	—
B5	III	0,77 %
B6	I	—
B7	III	10,08 %
B8	V	23,36 %
B9	V	9,13 %
B10	V	5,90 %
B11	VI	6,83 %
B12	II	4,55 %
B13	VI	8,65 %

4.1.4 Klonierungsergebnisse

Diejenigen Hybridomzellkulturen, deren Antikörper nur mit PBMC und Thymuszellen, nicht aber mit Bursazellen reagieren, wurden etabliert.

Neben den Kulturen A10 III E7 und B8 III H3 wurde noch zusätzlich die Kultur A5 IV G12 weitergeführt und konser-
viert. Diese Kultur produziert Antikörper, die nur mit PBMC

und Bursazellen, nicht aber mit Thymuszellen reagieren.

Um ihre Antikörperproduktion stabil zu erhalten, wurden die Kulturen mittels "limiting dilution" solange kloniert bzw. subkloniert, bis sie einer Poisson-Verteilung folgend mit einer Wahrscheinlichkeit von > 99 % als monoklonal angesehen werden konnten.

Dieses Ziel wurde bei Hybridom A10 III E7 schon nach der ersten, bei den Hybridomen A5 IV G12 und B8 III H3 nach der zweiten Klonierungsstufe erreicht.

Von der Kultur A10 III E7 wurden 3 Klone, von den Kulturen A5 IV G12 und B8 III H3 jeweils 3 Subklone etabliert und weitergeführt. Sie werden wie folgt bezeichnet:

A5 IV G12/A6.A2; -.C7; -.H2

A10 III E7.A4; -.E5; -.F5

B8 III H3/B6.C5; -.D3; -.F1

4.1.5 Produktion von monoklonalen Antikörpern über Aszites

Um größere Mengen an monoklonalen Antikörpern zu produzieren, wurden Zellen von jedem Subklon der Hybridome A10 III E7 sowie B8 III H3 an jeweils 3 mit Pristan vorbehandelte Mäuse intra-peritoneal verabreicht. Die Ausbeute an Aszites bei den einzelnen Mäusen geht aus Tabelle 12 hervor.

Bei 6 Mäusen trat keine Bildung von Aszites ein. Diesen standen 12 Mäuse gegenüber, die Aszites produzierten. Die Ausbeuten (4,5 bis 12,5 ml) variierten je nach Maus erheblich.

Tabelle 12: Produktion monoklonaler Antikörper über Aszites

Hybridom- zellklon	Aszites in ml			Gesamt	
	Maus Nr.:	1	2		3
A10 III E7.A4		12,5	—	—	12,5 ml
.E5		12,0	9,5	—	21,5 ml
.F5		5,5	6,5	—	12,0 ml
B8 III H3/B6.C5		4,5	6,5	4,0	15,0 ml
.D3		8,0	7,5	9,5	25,0 ml
.F1		4,5	—	—	4,5 ml

4.2 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

4.2.1 Bestimmung der Immunglobulinklassen und -subklassen

Von den Kulturen A10 III E7 bzw. B8 III H3 wurden im Agargel-Immunodiffusionstest jeweils 10-fach konzentrierte Zellkulturüberstände gegen Ziege-anti-Maus IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} sowie IgM getestet. Es wurde jeweils ein Doppelansatz durchgeführt.

A10 III E7: In beiden Ansätzen war jeweils nur eine Präzipitationslinie zwischen Zellkulturüberstand und anti-IgG₁ zu erkennen.

Der monoklonale Antikörper A10 III E7 stellt demnach ein Immunglobulin der Subklasse IgG₁ dar.

B8 III H3: Die Präzipitationslinien waren in beiden Ansätzen zwischen Zellkulturüberstand und anti-IgM zu erkennen. Weitere Reaktionen waren nicht zu beobachten.

Der monoklonale Antikörper B8 III H3 stellt damit ein Immunglobulin der Klasse IgM dar.

4.2.2 Bestimmung der Antikörpertiter

Die Antikörpertiter der Hybridome A10 III E7 und B8 III H3 wurden im Zellkulturüberstand und im Aszites sowohl im Zell-ELISA als auch im indirekten Immunofluoreszenztest bestimmt. Da die Antikörperkonzentration im Zellkulturüberstand insbesondere vom Zeitpunkt seiner Gewinnung abhängig ist, wurden von den beiden Hybridomen Kulturen angelegt, deren Oberstände einheitlich nach dem Absterben der Zellen gewonnen wurden. Die Titerbestimmung wurde vergleichenderweise im Zell-ELISA und in der IIF vorgenommen.

In Abbildung 2 werden die erzielten Titer als Balkendiagramm dargestellt.

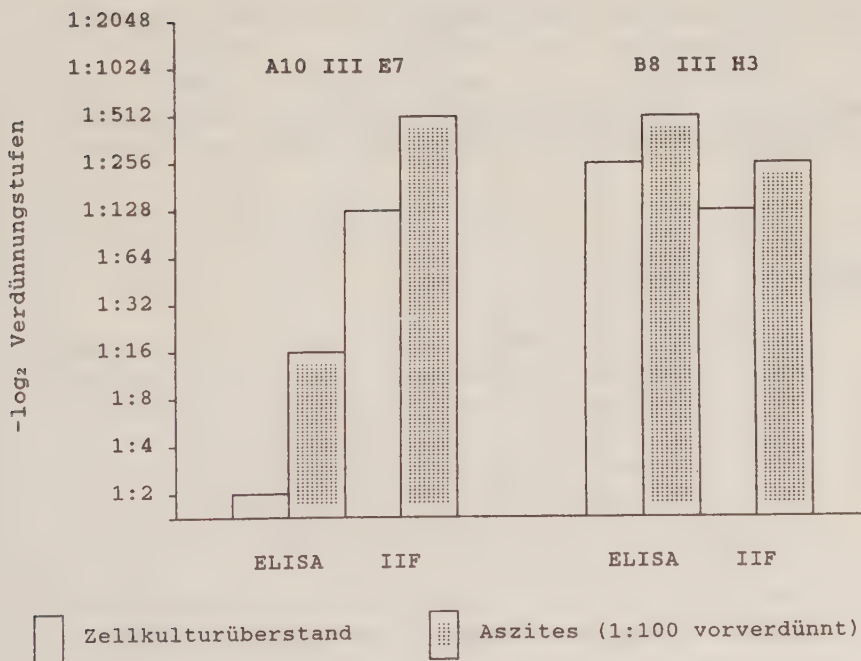
Wie aus Abbildung 2 ersichtlich ist, verhalten sich die Antikörpertiter der beiden Hybridome sehr unterschiedlich:

- Während die in der IIF gemessenen Antikörpertiter von A10 III E7 um das 64- (Zellkulturüberstand) bzw. 32-fache (Aszites) höher sind als die im Zell-ELISA gemessenen, rangieren die Titer im Zellkulturüberstand und Aszites von B8 III H3 sowohl in der IIF als auch im Zell-ELISA um je eine Verdünnungsstufe niedriger.
- Vergleicht man die in der IIF gemessenen Antikörpertiter von A10 III E7 mit denen von B8 III H3, so bewegen sie sich sowohl im Zellkulturüberstand als auch im Aszites in etwa der gleichen Größenordnung. Die im Zell-ELISA erziel-

ten Titer sind dagegen im Zellkulturüberstand von A10 III E7 um das 128- ,im Aszites um das 32-fache niedriger als im Zellkulturüberstand bzw. Aszites von B8 III H3.

- Bezüglich des Größenunterschieds der im Aszites und im Zellkulturüberstand gemessenen Antikörpertiter kann gesagt werden, daß sie im Aszites von A10 III E7 um das 400 bis 800-fache, von B8 III H3 um das 200-fache höher als die im Zellkulturüberstand gemessenen sind.

Abbildung 2: Titer von mAb A10 III E7 und B8 III H3 im Zellkulturüberstand und Aszites sowohl im Zell-ELISA als auch in IIF bestimmt



4.2.3 Bestimmung der Markierungsrate monoklonaler Antikörper an Bursa-, Milz- und Thymuszellen sowie PBMC mittels FACS-Analyse

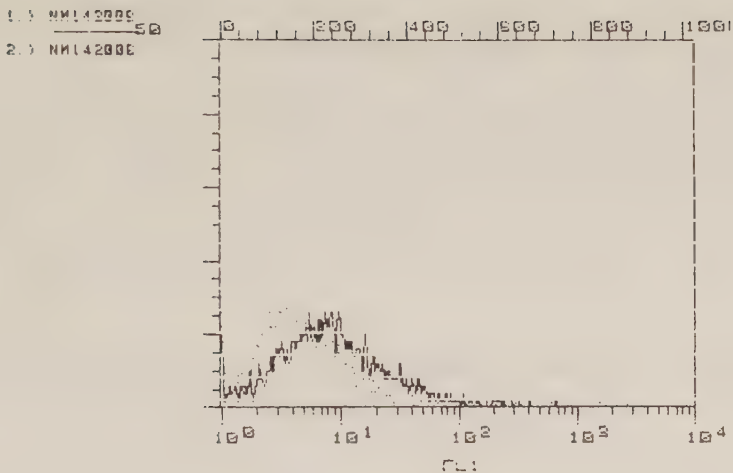
Die Spezifität der monoklonalen Antikörper A10 III E7 und B8 III H3 wurde aufgrund ihres Bindungsvermögens an verschiedenen lymphoiden Zellpopulationen mittels FACS-Analyse nach indirekter Immunofluoreszenz-Färbung der Zellen bestimmt. Anhand der Fluoreszenzprofile wurde der Prozentsatz markierter Bursa-, Milz- und Thymuszellen sowie PBMC ermittelt.

Die Auswertung der Histogramme erbrachte bei mAb A10 III E7 Markierungsraten von ca. 50 % Bursa-, 100 % Milz- und Thymuszellen sowie 100 % PBMC. Dabei war die Intensität der Fluoreszenz bei Bursazellen sehr gering.

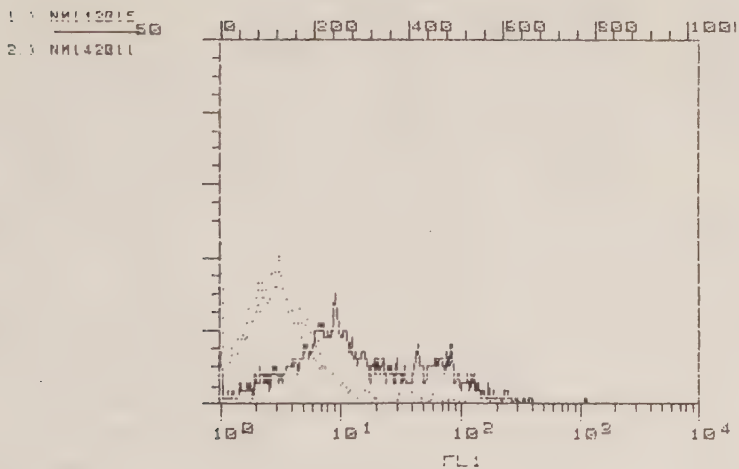
Der monoklonale Antikörper B8 III H3 reagiert dagegen mit ca. 2 % Bursazellen, ca. 5 % PBMC, ca. 15 % Milz- und ca. 80 % Thymuszellen. Er stellt demnach einen T-Zellspezifischen monoklonalen Antikörper dar. Die entsprechenden Histogramme werden in den Abbildungen 3 - 6 wiedergegeben.

Legende zu den Abbildungen 3 - 6:

Bestimmung der Spezifität des mAb B III H3 mittels Flow Cytometrie. Die dargestellten Histogramme geben die Fluoreszenzverhältnisse für Bursa- (Abbildung 3), Milz- (Abbildung 4), Thymuszellen (Abbildung 5) sowie PBMC (Abbildung 6) wieder. Dabei entspricht die Ordinate der relativen Anzahl grün fluoreszierender Zellen und die Abszisse der Fluoreszenzintensität als negativer dekadischer Logarithmus. Gepunktete Linien stellen die jeweilige Isotypkontrolle, durchgezogene Linien die Fluoreszenzprofile dar.



Abbildungung 3: (Bursazellen; Legende siehe Seite 60)



Abbildungung 4: (Milzzellen; Legende siehe Seite 60)

1.1 NM142010
50
2.1 NM142010

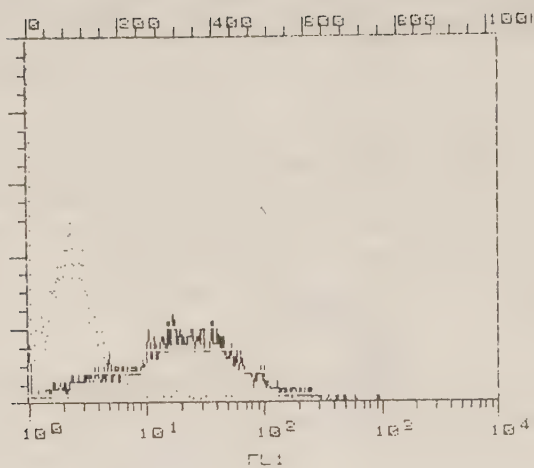


Abbildung 5: (Thymuszellen; Legende siehe Seite 60)

1.1 NM142004
50
2.1 NM142004

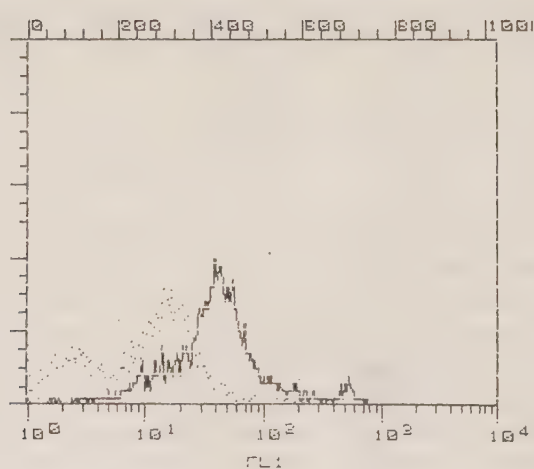


Abbildung 6: (PBMC; Legende siehe Seite 60)

4.2.4 Beeinflussung der Con A-induzierten Stimulation von PBMC durch monoklonale Antikörper

Der Einfluß des T-Zell-spezifischen monoklonalen Antikörpers B8 III H3 auf die Con A-induzierte Stimulation von PBMC wurde untersucht. Hierzu wurden PBMC vom Haushuhn zusammen mit Con A und Zellkulturüberstand von mAb B8 III H3 kultiviert. Die Stimulation der PBMC bzw. deren Hemmung wurde durch den Einbau von [3 H]Thymidin gemessen.

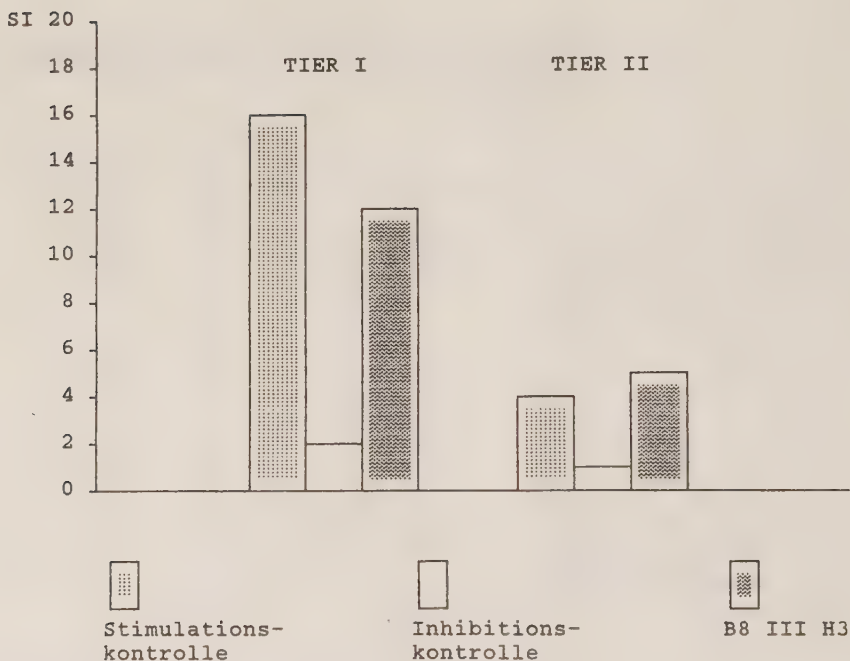
Tabelle 13: Beeinflussung der Con A-induzierten Stimulation von PBMC durch mAb B8 III H3

	Meßwerte in cpm	
	arithmetisches Mittel ($\bar{x}$)	Standardabweichung ($\pm$ SD)
Tier Nr.: 1		
Einbaukontrolle	68	23
Stimulationskontrolle	1123	195
Inhibitionskontrolle (Zellkulturüberstand von mAb6)	164	22
B8 III H3	855	133
Tier Nr.: 2		
Einbaukontrolle	191	74
Stimulationskontrolle	750	67
Inhibitionskontrolle (Zellkulturüberstand von mAb6)	146	6
B8 III H3	1043	706

Der Test wurde jeweils als 3-fach Ansatz mit PBMC aus zwei verschiedenen Tieren durchgeführt.

Aus den Meßwerten, registriert als cpm, wurde jeweils das arithmetische Mittel ($\bar{x}$) mit der dazugehörigen Standardabweichung ($\pm SD$) errechnet. Die Meßwerte sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Abbildung 7: Stimationsindizes für mAb B8 III H3 sowie der Stimations- und Inhibitionskontrolle (Zellkulturüberstand von mAb6) an PBMC zweier verschiedener Tiere



Für die Stimulations- und Inhibitionskontrolle (Zellkultur-überstand von mAb6) sowie für mAb B8 III H3 wurde der Stimulationsindex (SI; Quotient aus den Werten der stimulierten Probe zur Einbaukontrolle) gebildet und miteinander verglichen. In Abbildung 7 werden die einzelnen Stimulationsindizes als Balkendiagramm dargestellt.

Wie aus Abbildung 7 und Tabelle 13 ersichtlich ist, beeinflusst mAb B8 III H3 die Con A-induzierte Stimulation von PBMC nicht.

4.3 Zusammensetzung von PBMC nach ihrer Isolation im Ficoll-Dichtegradienten

Durch Zentrifugation im Ficoll-Dichtegradienten wurden aus heparinisiertem Hühnerblut PBMC isoliert. Die Zusammensetzung der Leukozytenfraktion wurde bei 5 Zellisolationen untersucht. Hierzu wurde je ein Zytozentrifugenpräparat angefertigt, gefärbt und die einzelnen Zellpopulationen durch Auszählen von jeweils 200 Zellen differenziert.

Die prozentualen Anteile der einzelnen Leukozytenpopulationen gehen aus Tabelle 14 hervor.

Die isolierte Zellfraktion bestand durchschnittlich aus 79,8 % Lymphozyten, 7,0 % Monozyten, 8,7 % heterophilen-, 0,9 % eosinophilen- und 0,8 % basophilen Granulozyten sowie 2,2 % Spindelzellen und 0,6 % Retikulozyten.

Bemerkenswert ist der hohe Grad an Verunreinigung der isolierten PBMC durch polymorphkernige Granulozyten (10,4 %), wohingegen der Anteil an Spindelzellen und Retikulozyten (zusammen 2,8 %) gering ist.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Leukozytenfraktion nach ihrer Isolation im Ficoll-Dichtegradienten

Zell- population in %	Tier Nummer					Mittel- wert ($\bar{x}$)	
	I	II	III	IV	V		$\pm$ SD
Lymphozyten	82,0	80,0	79,5	76,5	81,0	79,8	1,860
Monozyten	7,0	6,5	7,5	5,5	8,5	7,0	1,000
Granulozyten:							
Heterophile	7,5	8,5	9,0	10,0	8,5	8,7	0,812
Eosinophile	1,0	1,5	0,5	—	1,5	0,9	0,583
Basophile	1,0	1,0	1,5	0,5	—	0,8	0,509
Spindelzellen	1,5	2,0	1,5	5,5	0,5	2,2	1,720
Retikulozyten	—	0,5	0,5	2,0	—	0,6	0,735
Gesamt	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	

5 DISKUSSION

Im Verständnis der bei der Immunantwort ablaufenden zellulären Mechanismen wurden in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte erzielt.

An dieser Entwicklung war die Einführung der Hybridoma-Technologie in die Biowissenschaften und Medizin durch KÖHLER und MILSTEIN (1975) maßgeblich beteiligt. Die von ihnen entwickelte Technik der Herstellung monoklonaler Antikörper gestattete es erstmals, definierbare Nachweisreagenzien gegen antigene Determinanten auf Zelloberflächen herzustellen.

Durch ihre Anwendung konnte zum einen die B- und T-Zell-Reifung untersucht, zum anderen konnten aber auch einzelne T-Zell-Subpopulationen differenziert und funktionell charakterisiert werden.

Frühere Untersuchungen am Modell Haushuhn lieferten aufgrund seiner zwei, sowohl morphologisch als auch funktionell voneinander getrennten, primären lymphatischen Organe (Bursa fabricii; Thymus) wertvolle Hinweise über grundlegende Funktionen des B- und T-Zell-Systems (COOPER et al., 1966).

Gemessen am heutigen Kenntnisstand ist das T-Zell-System des Haushuhns, im Vergleich zu demjenigen beim Säuger, noch verhältnismäßig wenig erforscht, was hauptsächlich am Mangel geeigneter Nachweisreagenzien für verschiedene T-Zell-Subpopulationen liegt. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren nur wenige monoklonale Antikörper, die vorwiegend gegen verschiedene Reifungsstadien von Thymozyten gerichtet sind, verfügbar (Zusammenfassung siehe CHEN und COOPER, 1987).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weitere monoklonale Antikörper gegen Differenzierungsantigene von Hühner-T-Lymphozyten zu produzieren und die von ihnen erkannten T-Zell-Subpopulationen funktionell zu charakterisieren.

Den theoretischen Hintergrund der Herstellung monoklonaler Antikörper bildet die von BURNET (1959) aufgestellte Hypothese der klonalen Selektion. Diese besagt, daß jeder einzelne B-Lymphozyt die Fähigkeit besitzt, einen bestimmten monospezifischen Antikörper zu produzieren. Da die klonale Anzüchtung von sensibilisierten B-Lymphozyten in Zellkultur zur Zeit noch nicht durchführbar ist, muß der Umweg über die Tumorzelle beschritten werden. Die aus der Fusion von Myelom- und Plasmazelle entstandene Hybridomzelle vereinigt die Eigenschaft der Myelomzelle zum permanenten Wachstum mit der Fähigkeit der Plasmazelle, einen bestimmten Antikörper zu synthetisieren.

Monoklonale Antikörper können im syngenem System, wie z.B. dem der Maus (KÖHLER und MILSTEIN, 1975), der Ratte (CLARC et al., 1983) oder des Menschen (KOZBOR und RODER, 1983), aber auch im xenogenen System (GALFRE et al., 1977) hergestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Maus-System herangezogen. Es stellt das derzeit best charakterisierte und meistbenutzte System dar.

Die Zellfusionen wurden nach der Methode von KÖHLER und MILSTEIN (1975), entsprechend einer der in der Literatur beschriebenen Modifikationen (PETERS et al., 1985) unter Verwendung von PEG als Fusionsvermittler (PONTECORVO, 1975), durchgeführt. Bei der Kultivierung der Hybridomzellen wurde dabei auf die Verwendung von "Feeder-Zellen" verzichtet, da ihre Funktion bereits durch nicht-fusionierte Milzzellen ausgeübt wird (GALFRE et al., 1977).

Im Verlauf dieser Arbeit wurden insgesamt 33 Zellfusionen zwischen Milzzellen der Maus, die mit Thymuszellen bzw. PBMC des Haushuhns immunisiert waren und Myelomzellen der Linie X63-Ag8.653 angesetzt. Daraus gingen insgesamt 4660 Hybridomzellkulturen hervor.

Bis auf Fusion A12 zeigten alle Zellfusionen Hybridomwachstum. Dabei lagen die Fusionsfrequenzen im Bereich von $1:2,12 \times 10^6$ bis $1:4,90 \times 10^4$ Hybridomzellen pro eingesetzte Milzzellen. Dies liegt im Rahmen der in der Literatur angegebenen Ausbeute von einer Hybridomzelle je 10^5 bis 10^7 Milzzellen (CAMPBELL, 1984). Bei der Berechnung wurde von der Voraussetzung ausgegangen, daß in jeder Plattenvertiefung nur eine Hybridomzelle kultiviert wurde. Aus diesem Grund können sicherlich höhere Fusionsfrequenzen unterstellt werden, da nach De BLAS et al. (1983) die Zahl der in jeder Kavität kultivierten Hybridomzellen entsprechend einer Poisson-Verteilung mit der Anzahl der Plattenvertiefungen die Koloniewachstum zeigen, zunimmt.

Neben der technischen Durchführung ist die Immunisierung der BALB/c Mäuse für den Erfolg der angesetzten Zellfusion von ausschlaggebender Bedeutung. So geht die Ausbeute Antigen-spezifischer Hybridome mit der Zunahme aktivierter B-Lymphoblasten in der Milz einher (STÄHLI et al., 1980).

Als Antigen dienten in Zellkulturmedium suspendierte PBMC oder Thymuszellen vom Haushuhn in einer Konzentration von 2×10^7 Zellen pro Injektion (PINK und RIJNBEEK, 1983). Zunächst wurde auf den Zusatz eines Adjuvants verzichtet, da intakte xenogene Zellen ein strenges Immunogen darstellen (KENNETT et al., 1978). Die Applikation der Zellen erfolgte bei Immunisationsschema I - IV zunächst i.p., wohingegen die letzte Auffrischung i.v. erfolgte, um den Booster-Effekt zu verstärken (BRODSKY et al., 1979).

Bei Immunisationsprotokoll I und II wurde nur einmal im Abstand von 4 Wochen geboostert. Damit sollten monoklonale Antikörper hoher Spezifität induziert werden. Demgegenüber wurden bei den Schemata III und IV je 3 Auffrischungen verabreicht, um monoklonale Antikörper der Immunglobulinklasse IgG zu erhalten (GODING, 1983).

Bei Protokoll II und IV wurden Thymuszellen verwendet. Die letzte Auffrischung erfolgte dagegen mit PBMC, womit besonders solche Memoryzellen aktiviert werden sollten, die sowohl Antigene auf Thymuszellen als auch auf reifen T-Lymphozyten erkennen.

In Versuchsreihe B wurden zur Immunisierung der BALB/c Mäuse PBMC von TCR2-behandelten Tieren verwendet. Periphere T-Lymphozyten dieser Tiere exprimieren mit bis zu 75 % einen weiteren, "TCR3" bezeichneten T-Zell-Rezeptor. Im Vergleich dazu tragen nur ca. 8 % der T-Zellen normaler Tiere diese Oberflächenstruktur (CIHAK und LÖSCH, unveröffentlichte Ergebnisse). Durch ihre Verwendung sollte die Wahrscheinlichkeit der Gewinnung eines gegen "TCR3" gerichteten monoklonalen Antikörpers erhöht werden.

Da die Ausbeute Antikörper-produzierender Hybridomkulturen bei Immunisation der BALB/c Mäuse entsprechend den Schemata I - IV nicht zufriedenstellend war, wurden in Protokoll V und VI die Zellen zur Verbesserung der Immunantwort bei der Erstimmunisierung zusammen mit Freund's Complete Adjuvant verabreicht (ALLISON und DAVIES, 1971).

Die Milzzellen wurden 3 Tage nach der letzten Boosterung zur Fusion gebracht, da zu diesem Zeitpunkt die Zahl der stimulierten B-Lymphoblasten in der Milz am höchsten ist (KENNETT et al., 1978).

Das Vermögen der einzelnen Immunisationsschemata, Antigen-spezifische Hybridome zu induzieren, wurde untersucht. Hierzu wurde der prozentuale Anteil derjenigen Hybridomzellkulturen bestimmt, die in indirekter Immunofluoreszenz nachweisbare Antikörper gegen das zur Immunisation benutzte Antigen produzierten. Dabei wiesen diejenigen Zellfusionen, bei denen Mäuse zusammen mit FCA grundimmunisiert wurden, eine Ausbeute von 5,90 - 23,36 % an Hybridomen auf, die gegen Hühnerlymphozyten gerichtete Antikörper produzierten. Nach Verwendung von

Mäusen die entsprechend Schema I bis IV immunisiert wurden, sezernierten lediglich 0 bis 4,55 % der Hybridomkulturen solche Antikörper, wobei zwischen kurzen und langen Immunisationsschemata kein Unterschied bestand. Als Ausnahme muß jedoch Fusion B7 erwähnt werden, bei der nach Immunisation mit Schema III 10,08 % der Hybridomkulturen gegen Hühnerlymphozyten gerichtete Antikörper produzierten. Diese Beobachtung widerspricht dem allgemeinen Grundsatz, daß bei der Immunisation mit Zellen ein Zusatz von Adjuvantien unnötig ist. STAHLI et al. (1980) beschrieben in diesem Zusammenhang eine Ausbeute von 5 - 20 % Antikörper-produzierender Hybridome nach Immunisation der Tiere mit zellulärem Antigen.

Bei der Herstellung monoklonaler Antikörper stellt die zur Identifikation und Selektion Antigen-spezifischer Hybridome angewandte Strategie einen ausschlaggebenden Faktor dar. Mit Hilfe geeigneter Testsysteme sollen diejenigen Hybridomzellkulturen isoliert werden, die im weiteren Verlauf der Arbeit Verwendung finden. Hierbei wird die Wahl des Screening-Systems von verschiedenen Faktoren, wie Spezifität (Vermeidung falsch-negativer bzw. falsch-positiver Ergebnisse), Nachweisempfindlichkeit und Zeitaufwand zur Durchführung des Tests, beeinflußt. Darüberhinaus soll die Art des Nachweisystems dem endgültigen Verwendungszweck des monoklonalen Antikörpers weitgehend entsprechen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden monoklonale Antikörper, die gegen periphere T-Lymphozyten beim Haushuhn gerichtet sind, in 2 Schritten selektiert:

In einem ersten Screening-Test wurde zunächst die Reaktivität der Zellkulturüberstände mit PBMC getestet. In Versuchsreihe A wurde hierfür ein indirekter, nicht-kompetitiver Zell-ELISA verwendet (SUTER et al., 1980), bei dem die Zellen fixiert und an eine feste Phase gebunden waren. In Versuchsreihe B fand ein indirekter Immunofluoreszenztest Verwendung, der die Beurteilung der Reaktion monoklonaler Antikörper an einer

einzelnen, nativen Zelle erlaubte.

Alle positiven Reagenten wurden nachfolgend in einem zweiten Screening-Test mittels indirekter Immunofluoreszenz auf ihre Reaktion mit Bursa- bzw. Thymuszellen getestet, um diejenigen monoklonalen Antikörper zu identifizieren, die T-Zell-Spezifität besitzen.

Insgesamt wurden in der 1. Selektionsstufe 294 PBMC-positive Hybridomzellkulturen isoliert, wobei 98 aus Versuchsreihe A und 196 aus Versuchsreihe B hervorgingen. Von ihnen reagierten in der 2. Selektionsstufe 30 (31 %) bzw. 149 (76 %) mit Bursa- und/oder Thymuszellen.

Eine der für diesen Unterschied verantwortlichen Ursachen erklärt sich aus den in der jeweiligen Selektionsstufe verwendeten Zielzellen. Während in der 1. Selektionsstufe PBMC benutzt wurden, kamen in der 2. Selektionsstufe Bursa- bzw. Thymuszellen zum Einsatz. Tatsächlich ergab die Untersuchung isolierter PBMC lediglich einen durchschnittlichen Gehalt von 80 % Lymphozyten. Der restliche Anteil verteilte sich auf 7.0 % Monozyten, 10 % polymorphkernige Granulozyten und 3 % Spindelzellen und Retikulozyten. Die höhere Reaktionsrate mit PBMC könnte demnach durch die Reaktion der Zellkulturüberstände mit Monozyten oder Granulozyten bedingt sein. Darüberhinaus ist auch eine Reaktion mit Lymphozytenantigenen vorstellbar, die weder von Bursa- noch von Thymuszellen exprimiert werden.

Die höhere Frequenz positiver Kulturen bei Anwendung des Zell-ELISA, die in indirekter Immunofluoreszenz weder mit Bursa- noch mit Thymuszellen reagierten, steht im Zusammenhang mit der Verwendung fixierter Zellen. Durch die Fixation kommt es zur Freisetzung intrazellulärer löslicher Antigene (FEIT et al., 1983), gegen die während der Ausbildung der Immunantwort ebenfalls Antikörper gebildet wurden. Monoklonale Antikörper gegen solche Antigene markieren dagegen intakte Zellen nicht.

Die Fixation von Zellen kann aber auch zu Veränderungen membranassoziierter antigener Determinanten führen, was wiederum falsch-negative Ergebnisse hervorrufen kann. PETERS et al. (1985) untersuchten in diesem Zusammenhang die Reaktivität verschiedener monoklonaler Antikörper mit fixierten und nicht-fixierten Zellen. Dabei beobachteten sie einige monoklonale Antikörper, die das entsprechende fixierte Antigen nicht erkannten. Demgegenüber berichten SUTER et al. (1980) von keinem nennenswerten Verlußt antigener Aktivität im Zell-ELISA nach Fixation der Zellen.

In der 2. Selektionsstufe wurden alle PBMC-positiven Hybridomkulturen auf ihre Spezifität für Bursa- bzw. Thymuszellen überprüft. Dabei reagierten von insgesamt 179 Kolonien lediglich 2 spezifisch mit T-Zellen, dagegen 52 spezifisch mit B-Zellen. 125 monoklonale Antikörper markierten sowohl B- als auch T-Zellen. Diese Verteilung entspricht der Beobachtung von PESCOVITS et al. (1984), die in ihren Versuchen zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen funktionelle T-Zell-Subpopulationen beim Schwein ebenfalls ein ähnliches Verteilungsmuster beobachtet haben. Obwohl sie mit Thymozyten vom Schwein immunisierten, war die Mehrzahl der produzierten monoklonalen Antikörper gegen monomorphe Determinanten auf Lymphozyten und Makrophagen gerichtet. Desweiteren isolierten auch sie einige monoklonale Antikörper, die spezifisch mit Oberflächen-Immunglobulinen auf B-Lymphozyten reagierten.

Die insgesamt mäßige Ausbeute von lediglich 2 T-Zell-spezifischen monoklonalen Antikörpern aus 294 PBMC-positiven Hybridomkulturen entspricht der Beobachtung von BORST et al. (1988). Sie versuchten monoklonale Antikörper gegen den humanen γ/δ TCR herzustellen. Von 344 Antikörper-produzierenden Hybridomen konnte nur ein Hybridom isoliert werden, das spezifisch mit dem entsprechenden Antigen reagierte. Andererseits gelang es CHEN et al. (1988) aus einer auffallend geringen Anzahl hergestellter Hybridome eine Reihe T-Zell-

spezifischer monoklonaler Antikörper beim Haushuhn zu isolieren. Als Erklärung hierfür diskutierten sie die große phylogenetische Distanz zwischen Maus und Huhn.

Ein weiteres Problem bei der Herstellung monoklonaler Antikörper stellt die Instabilität einzelner Hybridomzellkulturen dar, die sich im Verlust der Fähigkeit zur Antikörper-Produktion äußert. KÖHLER et al. (1976) machen hierfür einen spontanen Chromosomenverlust verantwortlich. Da nicht-produzierende Hybridomkulturen eine höhere Teilungsrate aufweisen (GERHARD et al., 1978), können sie nachfolgend Antikörper-produzierende Kolonien überwachsen. Um diesem Phänomen zu entgegnen, müssen Antikörper-positive Hybridomkulturen möglichst frühzeitig und wiederholt kloniert werden, womit die Produktion von Antikörpern gleicher Spezifität und Affinität gewährleistet wird. Mit Hilfe der "limiting dilution" Methode (GALFRE und MILSTEIN, 1981) wurde erreicht, daß alle Zellen einer Kolonie nur von einer Elternzelle abstammen. Das Ergebnis der einzelnen Klonierungsstufen wurde sowohl durch mikroskopische Kontrolle als auch durch statistische Wahrscheinlichkeitsberechnung überwacht. Bei der Zellklonierung wurde der Effekt eines "feeder layer" auf das Klonierungsergebnis von mehreren Autoren herausgestellt. GODING et al. (1980) führen dies sowohl auf die Synthese von Wachstumsfaktoren als auch auf die Phagozytose von Zelldetritus zurück. Im Verlauf dieser Arbeit wurde auf syngene Milz- (LEVY et al., 1978) bzw. Thymuszellen (LEHNHARDT et al., 1978) zurückgegriffen. Insgesamt wurden die beiden T-Zell-spezifischen Hybridome A10 III E7 und B8 III F3 sowie eine B-Zell-spezifische Kultur (A5 IV G12) kloniert und propagiert.

Monoklonale Antikörper können sowohl über Zellkulturüberstand, in dem Proteinkonzentrationen von 10 - 100 µg/ml erreicht werden (SECHER, 1980), als auch über Aszites gewonnen werden (BRODEUR et al., 1984). Dabei ist der Gehalt an monoklonalen Antikörpern im Aszites um ein Vielfaches höher als im Zellkulturüberstand (HOOGENRAAD und WRAIGHT, 1987). In der

vorliegenden Arbeit wurde von jedem Subklon der Hybridome A10 III E7 bzw. B8 III F3 Aszites aus 3 Mäusen produziert. Die Ausbeute variierte dabei erheblich. So konnte je nach Klon im Durchschnitt zwischen 4,5 und 12,5 ml Aszites pro Maus gewonnen werden. Der Aszites wurde durch Zentrifugation bzw. Ultrazentrifugation von zellulären und anderen gröberen Bestandteilen gereinigt und in dieser Form für die Durchführung der Tests verwendet. Eine weitere Reinigung bzw. Konzentration der monoklonalen Antikörper war hierfür nicht erforderlich.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die beiden T-Zell-spezifischen monoklonalen Antikörper A10 III E7 und B8 III H3 bzw. die von ihnen erkannten Zell-Subpopulationen charakterisiert.

Zunächst erfolgte die Zuordnung der monoklonalen Antikörper zu einer Immunglobulinklasse bzw. -subklasse. Der monoklonale Antikörper A10 III E7 stellt ein Immunglobulin der Subklasse IgG₁ dar. Der monoklonale Antikörper B8 III F3 gehört dagegen der Immunglobulinklasse IgM an. Dies ist auf das kurze Immunisierungsschema zurückzuführen, da Antikörper der Klasse IgM zu Beginn der Immunantwort ausgebildet werden. (GODING, 1980).

Die Bestimmung der im Zellkulturüberstand und Aszites ausgebildeten Antikörpertiter erfolgte vergleichenderweise im Zell-ELISA und in IIF. Dabei lagen die im Aszites erzielten Titer von mAb A10 III E7 um das 400- (IIF) bis 800- (Zell-ELISA) fache, von mAb B8 III H3 um das 200- (IIF und Zell-ELISA) fache höher als im Zellkulturüberstand. Dieser Titerunterschied erklärt sich aus den im Zellkulturüberstand und Aszites erreichbaren Antikörperkonzentrationen.

Betrachtet man die Sensitivität der benutzten Nachweissysteme, so reagiert der Zell-ELISA bei mAb B8 III H3 um eine Verdünnungsstufe empfindlicher, bei mAb A10 III E7 um 5

(Aszites) bzw. 6 (Zellkulturüberstand) Verdünnungsstufen niedriger als die IIF. Die relativ niedrigen Titer von mAb A10 III E7 im Zell-ELISA erklären sich hauptsächlich aus der Verwendung von PBMC als Zielzellen. So kann das erkannte Antigen beispielsweise nur in sehr geringer Dichte oder nur von einer kleinen Zellpopulation bzw. -subpopulation exprimiert werden.

FEIT et al. (1982) verglichen die Sensitivität der beiden Nachweissysteme und konnten, allerdings unter Verwendung intakter Zellen im Zell-ELISA, teilweise noch weitaus deutlichere Titerunterschiede zugunsten des Zell-ELISA feststellen.

Ungeachtet der Problematik beim Screening gegen Zell-Subpopulationen erweist sich der Zell-ELISA beim Screening von Hybridomkulturüberständen als ein Nachweissystem von ausreichender Sensitivität (SUTER et al., 1980).

Die Spezifität der beiden T-Zell-reaktiven monoklonalen Antikörper A10 III E7 und B8 III H3 wurde anhand ihres Bindungsvermögens an verschiedenen lymphoiden Zellpopulationen bestimmt. Die FACS-Analyse ergab für mAb A10 III E7 Markierungsraten von ca. 50 % Bursazellen, sowie 100 % Milz-, Thymuszellen und PBMC. Diese Ergebnisse widersprechen denen der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung während der 2. Selektionsstufe, wo dieser mAb nur mit Thymuszellen und PBMC, nicht aber mit Bursazellen reagierte. Die Tatsache, daß die in der FACS-Analyse registrierte Fluoreszenz der Bursazellen sehr gering ist, legt den Schluß nahe, daß das erkannte Antigen von Bursazellen in einer geringen Dichte exprimiert wird.

MAb B8 III H3 zeigte Markierungsraten von ca. 80 % Thymus-, ca. 15 % Milzzellen, ca. 5 % PBMC und von praktisch keinen Bursazellen. Es liegt somit T-Zell-Spezifität vor. Allerdings entspricht dieses Verteilungsmuster keinem der beim Haushuhn beschriebenen Differenzierungsantigene. So würde z.B. CT3,

ein monoklonaler Antikörper gegen CD3 30 % Thymus-, 60 % Milzzellen und 70 % PBMC (CHEN et al., 1986); CT4, ein monoklonaler Antikörper gegen CD4 70 % Thymuszellen, 45 % PBMC, 10 % Milzzellen und weniger als 1 % Bursazellen (CHAN et al., 1988) und CT8, ein monoklonaler Antikörper gegen CD8 80 % Thymus-, 50 % Milzzellen und 15 % PBMC (CHAN et al., 1988) markieren.

Der T-Zell-spezifische mAb B8 III H3 wurde hinsichtlich seines Effekts auf die Mitogen-induzierte Proliferation von PBMC untersucht. Als Mitogen diente Con A, ein polyklonaler T-Zell-Aktivator. Monoklonale Antikörper, die gegen den CD3/TCR-Komplex gerichtet sind, können einerseits die Proliferation oder IL 2-Produktion von T-Lymphozyten stimulieren, andererseits aber auch die Antigen- und Mitogen-induzierte Proliferation bzw. die zytotoxische Aktivität von T-Zellen inhibieren (ÖTTGEN und TERHORST, 1987). Aus unseren Tests ging hervor, daß mAb B10 III H3 die Mitogen-induzierte Proliferation nicht hemmt. Demnach ist dieser mAb nicht gegen ein Epitop auf dem CD3/TCR-Komplex gerichtet.

Um die Frage seiner genauen Spezifität zu klären, müssen noch die Ergebnisse zur Molekulargewichtsbestimmung des erkannten Antigens abgewartet werden. Da der Isotopenraum am hiesigen Institut wegen Umbaumaßnahmen derzeit nicht für die Jodierung der Zelloberflächenantigene mit ^{125}Jod zur Verfügung steht, wird die Molekulargewichtsbestimmung freundlicherweise von Herrn Dr. Olli Vainio am Basel Institute für Immunologie, Schweiz, durchgeführt.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen Oberflächenantigene von T-Lymphozyten beim Haushuhn.

In 2 Versuchsreihen wurden insgesamt 33 Zellfusionen zwischen Milzzellen von BALB/c Mäusen, die mit Thymuszellen bzw. PBMC vom Haushuhn immunisiert waren und Myelomzellen der Linie X63-Ag8.653 unter Verwendung von Polyethylen Glycol als Fusionsvermittler durchgeführt. Bis auf eine Zellfusion waren alle Fusionsansätze erfolgreich. Aus insgesamt 16044 angesetzten Plattenvertiefungen gingen 4660 verschiedene Hybridomzellkulturen hervor. Dies entspricht durchschnittlichen Fusionsfrequenzen von einer Hybridomzelle aus mindestens $4,90 \times 10^4$ bis $2,12 \times 10^6$ eingesetzten Milzzellen. Die Hybridomzellkulturen wurden in einer 1. Selektionsstufe auf ihre Produktion von Antikörpern gegen PBMC getestet, wozu in Versuchsreihe A ein Zell-ELISA und in Versuchsreihe B ein indirekter Immunofluoreszenztest als Nachweissystem herangezogen wurde. Alle 294 positiven Reagenten wurden in einer 2. Selektionsstufe mittels IIF auf ihre Reaktivität gegen Bursa- und Thymuszellen getestet. Dabei reagierten 2 Hybridome nur mit Thymuszellen, 52 nur mit Bursazellen und 125 mit beiden Zellpopulationen. 115 PBMC-positive Hybridomzellkulturen markierten dagegen weder Bursa- noch Thymuszellen.

Die beiden T-Zell-reaktiven Hybridome A10 III E7 und B8 III H3 wurden kloniert bzw. subkloniert, propagiert und konserviert. Nach intra-peritonealer Verabreichung von Hybridomzellen an mit Pristan vorbehandelte syngene Mäuse wurden größere Mengen an monoklonalen Antikörpern in Form von Aszites produziert.

Die beiden monoklonalen Antikörper bzw. die von ihnen erkannten T-Zell-Subpopulationen wurden anschließend charakterisiert.

Zunächst wurden die beiden monoklonalen Antikörper einer Immunglobulinklasse bzw. -subklasse zugeordnet. MAb A10 III E7 wurde dabei als Immunglobulin der Subklasse IgG₁ und mAb B8 III H3 als Immunglobulin der Klasse IgM identifiziert.

Die Titer der beiden monoklonalen Antikörper wurden im Zellkulturüberstand und im Aszites sowohl im Zell-ELISA als auch mittels indirekter Immunofluoreszenz bestimmt. Dabei waren die im Aszites gemessenen Titer um das 400- bis 800-fache (A10 III E7) bzw. das 200-fache (B8 III H3) höher als die im Zellkulturüberstand. Der Zell-ELISA erwies sich dabei von ausreichender Sensitivität.

Die Spezifität der beiden monoklonalen Antikörper wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. MAb A10 III E7 reagierte mit jeweils 100 % Milz- und Thymuszellen sowie PBMC. Daneben markierte er, wenn auch nur sehr schwach, Bursazellen.

MAb B8 III H3 markierte dagegen spezifisch T-Zellen. Er reagierte mit ca. 80 % Thymuszellen, ca. 15 % Milzzellen, ca. 5 % PBMC aber nicht mit Bursazellen.

Der Effekt des T-Zell-spezifischen monoklonalen Antikörpers B8 III H3 auf die Con A-induzierte Stimulation von PBMC wurde untersucht. Dabei zeigte sich, daß dieser monoklonale Antikörper die Con A-induzierte Stimulation von PBMC nicht inhibiert.

7 SUMMARY

PRODUCTION and CHARACTERIZATION of MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CHICKEN T-CELL ANTIGENS

The aim of this thesis was the production and characterization of monoclonal antibodies against chicken T-cell antigens.

In two test series a total of 33 fusions between spleen cells of BALB/c mice which had previously been immunized with chicken thymocytes or PBMC respectively, and myeloma cells of line X63-Ag8.653 were carried out with the help of polyethylene glycol as fusion agent. All but one cell fusions were carried out successfully. The original count of 16044 wells yielded in 4660 different hybridomas. This corresponds to an average fusion frequency of one hybridoma cell per 4.90×10^4 - 2.12×10^6 spleen cells.

In a first selection stage hybridomas were screened against PBMC. In test series A a cell ELISA and in series B an indirect immunofluorescent test were used as assay systems. In a second selection stage all 294 positive reactants were tested against bursa- and thymocytes. Here two 2 hybridomas reacted solely with thymocytes, 52 only with bursocytes and 125 reacted with both cell populations. 115 PBMC positive hybridomas however showed no reaction.

The two T-cell reactive hybridomas A10 III E7 and B8 III H3 were cloned, subcloned, propagated and finally preserved. After i.p. application of hybridoma cells to Pristane primed syngeneic mice larger amounts of monoclonal antibodies were gained as ascites.

This was followed by a characterization of the two monoclonal antibodies and their reactive cell subpopulations.

Initially the immunoglobuline class and subclass of the monoclonal antibodies was determined. MAb A10 III E7 turned out to belong to subclass IgG₁ and mAb B8 III H3 was identified as IgM.

The titers of both monoclonal antibodies in supernatant and ascites were determined in two ways. This was done in cell ELISA as well as by way of indirect immunofluorescence. The resulting titers in ascites were 400 - 800 (A10 III E7) times and 200 (B8 III H3) times higher than in supernatant. The cell ELISA proved to be of sufficient sensitivity.

The specific properties of both monoclonal antibodies were determined by FACS analysis. MAb A10 III E7 reacted with 100 % of spleen and thymus cells as well as PBMC. This mAb also reacted with bursocytes however at a much lower intensity.

MAb B8 III H3 on the other hand turned out to be a specific T cell marker. It reacted with about 80 % thymocytes, 15 % spleen cells and 5 % PBMC. But it showed no reaction to bursocytes.

The effect of the T-cell specific mAb B8 III H3 on Con A-induced proliferation of chicken PBMC was investigated. MAb B8 III H3 showed no inhibitory capacity.

8 LITERATURVERZEICHNIS

ALLISON, A.C. and A.J.S. DAVIES, 1971

Requirement of Thymus-Dependent Lymphocytes for
Potentiation by Adjuvants of Antibody Formation

Nature 233, 330-332

ANDERSON, P.N. and M. POTTER, 1969

Induction of Plasma Cell Tumors in BALB/c Mice with
2,4,10,14-Tetramethylpentadecane (Pristane)

Nature 222, 994-995

ASHWOOD-SMITH, M.I., 1961

Preservation of Mouse Bone Marrow at -79°C with
Dimethylsulfoxide

Nature 190, 1204-1205

BALLIEUX, R.E. and C.J. HEIJNEN, 1983

Immunoregulatory T Cell Subpopulations in Man:
Dissection by Monoclonal Antibodies and Fc-Receptors

Immunol. Rev. 74, 5-28

BOEHMER, H.v., 1988

The Developmental Biology of T Lymphocytes

Ann. Rev. Immunol. 6, 309-326

BOYUM, A., 1968

Isolation of mononuclear cells and granulocytes from
human blood

Scand. J. clin.

Lab. Invest., 21 (suppl.97), 77-89

BORST, J., J.J.M. van DONGEN, R.L.H. BOLHUIS, P.J. PETERS, D.A. HALLER, E. de VRIES and R.J. van de GRIEND, 1988

Distinct molecular forms of human T cell receptor $\gamma/8$ detected on viable T cells by a monoclonal antibody

J. Exp. Med. 167, 1625-1644

BOUCHEIX, C., J.Y. PERROT, M. MIRSHAHI, A. BERNADOU and C. ROSENFELD, 1982

A Rapid Method for Detection of Membrane Antigens by Immunofluorescence and its Application to Screening Hybridoma Antibodies

J. Immunol. Methods 57, 145-150

BRENNER, M.B., J. McLEAN, D.P. DIALYNAS, J.L. STROMINGER, J.A. SMITH, F.L. OWEN, J.G. SEIDMAN, S. IP, F. ROSEN and M.S. KRANGEL, 1986

Identification of a putative second T-cell receptor

Nature 322, 145-149

BRODEUR, B.R., P. TSANG and Y. LAROSE, 1984

Parameters Affecting Ascites Tumour Formation in Mice and Monoclonal Antibody Production

J. Immunol. Methods 71, 265-272

BRODSKY, F.M., W.F. BODMER and P. PARHAM, 1979

Characterization of a monoclonal anti- β_2 -microglobulin antibody and its use in the genetic and biochemical analysis of major histocompatibility antigens

Eur. J. Immunol. 9, 536-545

BRÜGGEMANN, J., M. MERKENSCHLAGER, B., KIRCHNER und U. LÖSCH, 1967

Eine erbliche Hypo- bzw. Dysgammaglobulinämie beim Haushuhn

Naturwissenschaften 54, 1-2

BURNET, F.M., 1959

A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection

Austr. J. Sci. 20, 67-69

CAMPBELL, A.M., 1984

Monoclonal Antibody Technology. The Production and Characterization of rodent and human hybridomas.

(Ed.: BURDON, R.H. and P.H. van KNIPPENBERG) Elsevier Science Publishing Company Inc., Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford

CANTOR, H. and E.A. BOYSE, 1975

Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens: II. Cooperation between subclasses of Ly⁺ cells in the generation of killer activity

J. Exp. Med. 141, 1390-1399

CANTOR, H. and E.A. BOYSE, 1977

Regulation of cellular and humoral immune responses by T cell subclasses

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 23-32

CANTOR, H., F.W. SHEN and E.A. BOYSE, 1976

Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. II. Activation by antigen: After immunization, specific suppressor and helper activities are mediated by distinct T cell subclasses

J. Exp. Med. 143, 1391-1401

CHAN, M.M., C.H. CHEN, L.L. AGER and M.D. COOPER, 1988

Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens

J. Immunol. 140, 2133-2138

CIHAK, J., H.W.L. ZIEGLER-HEITBROCK, H. TRAINER, I.
SCHRANNER, M. MERKENSCHLAGER and U. LÖSCH, 1988

Characterization and functional properties of a novel
monoclonal antibody which identifies a T cell receptor
in chickens

Eur. J. Immunol. 18, 533-537

CHEN, C.H., L.L. AGER, G.L. GARTLAND and M.D. COOPER, 1986

Identification of a T3/T cell receptor complex in
chickens

J. Exp. Med. 164, 375-380

CHEN, C.H., T.C. CHANH and M.D. COOPER, 1984

Chicken thymocyte-specific antigen identified by
monoclonal antibodies: ontogeny, tissue distribution
and biochemical characterization

Eur. J. Immunol. 14, 385-391

CHEN, C.H., J. CIHAK, U. LÖSCH and M.D. COOPER, 1988

Differential expression of two T cell receptors, TCR1
and TCR2, on chicken lymphocytes

Eur. J. Immunol. 18, 539-543

CHEN, C.H. and M.D. COOPER, 1987

Identification of cell surface molecules on chicken
lymphocytes with monoclonal antibodies

In: Avian Immunology, Basis and Practice, Volume I
(Ed.: Toivanen, A. and P. Toivanen), CRC Press Inc.,
Boca Raton, Florida

CLARC, M., S. COBBOLD, G. HALE and H. WALDMAN, 1983

Advantages of rat monoclonal antibodies

Immunol. Today 4, 100-101

COOMBS, R.R.A., B.W. GURNER, A.B. WILSON, G. HOLM and B. LINDGREN, 1970

Rosette-Formation between Human Lymphocytes and Sheep Red Cells not involving Immunoglobulin Receptors

Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 39, 658-663

COONS, A.H., H.J. CREECH and R.N. JONES, 1941

Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group

Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 47, 198-202

COOPER, M.D., R.D.A. PETERSON, M.A. SOUTH and R.A. GOOD, 1966

The function of the thymus system and the bursa system in the chicken

J. Exp. Med. 123, 75-102

De BLAS, A.L., M.V. RATNAPARKHI and J.E. MOSIMANN, 1983

Estimation of the Number of Monoclonal Hybridomas in a Cell-Fusion Experiment

Methods Enzymol. 92, 36-39

DIALYNAS, D.P., B. WILDE, P. MARRACK, A. PIERRES, K.A. WALL, W. HAVRAN, G. OTTEN, M.R. LOKEN, M. PIERRES, J. KAPPLER and F.W. FITCH, 1983

Characterization of the murine antigenic determinant, designated L3T4a, recognized by monoclonal antibody GK 15: expression of L3T4a by functional T cell clones appears to correlate primarily with class II MHC antigen-reactivity

Immunol. Rev. 74, 28-56

ENGVAL, E. and P. PERLMANN, 1971

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.

Immunochemistry 8, 871-874

EVANS, R.L., J.M. BREARD, H. LAZARUS, S.F. SCHLOSSMAN and L. CHESS, 1977

Detection, isolation, and functional characterization of two human T cell subclasses bearing unique differentiation antigens

J. Exp. Med. 145, 221-233

FEIT, C., A.H. BARTAL, G. TAUBER, G. DYMBORT and Y. HIRSHAUT, 1982

An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Detection of Monoclonal Antibodies Recognizing Surface Antigens Expressed on Viable Cells

J. Immunol. Methods 58, 301-308

FORGET, A., E.F. POTWOROWSKI, G. RICHER and A.G. BORDUAS, 1970

Antigenic specificities of bursal and thymic lymphocytes in the chicken

Immunology 19, 465-468

FREDERICKSEN, T.L., B.M. LONGENECKER, F. PAZDERKA, D.G. GILMOUR and R.F. RUTH, 1977

A T-cell antigen system of chickens: Ly-4 and Marek's disease

Immunogenetics 5, 535-552

GALFRE, G., S.C. HOWE, C. MILSTEIN, G.W. BUTCHER and J.C. HOWARD, 1977

Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines

Nature 266, 550-552

GALFRE, G. and C. MILSTEIN, 1981

Preparation of monoclonal antibodies. Strategies and procedures

Methods Enzymol. 73, 3-46

GALTON, J. and J. IVANYI, 1977

Immunofluorescent detection of differentiation
alloantigens (CA1) in the chicken

Eur. J. Immunol. 7, 241-246

GERHARD, W., C.M. CROCE, D. LOPES and H. KOPROWSKI, 1978

Repertoire of antiviral antibodies expressed by somatic
cell hybrids

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1510-1514

GILMOUR, D.G., A. BRAND, N. DONNELLY and H.A. STONE, 1976

Bu-1 and Th-1, two loci determining surface antigens of
B or T lymphocytes in the chicken

Immunogenetics 3, 549-563

GODING, J.W., 1980

Antibody production by hybridomas

J. Immunol. Methods 39, 285-308

GODING, J.W., 1983

Immunoglobulin class switches.

In: Monoclonal antibodies: Principles and practice.
(Ed.: GODING, J.W.) Academic Press Inc., London,
pp. 27-28

HASKINS, K., R. KUBO, J. WHITE, M. PIGEON, J. KAPPLER and P.
MARRACK, 1983

The major histocompatibility complex-restricted antigen
receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal
antibody

J. Exp. Med. 157, 1149-1169

HUDSON, L. and I.M. ROITT, 1973

Immunofluorescent detection of surface antigens specific to T and B lymphocytes in the chicken

Eur. J. Immunol. 3, 63-67

HOOGENRAAD, N.I. and C.I. WRAIGHT, 1986

The effect of pristane on ascites tumor formation and monoclonal antibody production

Methods Enzymol. 121, 375-381

ISAKOVIC, K., K. MITROVIC, B.M. MARKOVIC, M. RAJCEVIC and B.D. JONKOVIC, 1975

Preparation of specific anti-thymocyte and anti-bursocyte sera in rabbits

J. Immunol. Methods 7, 359-369

IVANYI, J. and P.M. LYDYARD, 1972

Delineation of chicken lymphocyte populations by specific anti-thymus and anti-bursa sera

Cell. Immunol. 5, 180-189

JANDINSKI, J., H. CANTOR, T. TADAKUMA, D.L. PEAVY and C.W. PIERCE, 1976

Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. I. Polyclonal activation: suppressor and helper activities are inherent properties of distinct T-cell subclasses

J. Exp. Med. 143, 1382-1390

JOTEREAU, F.V. and N.M. Le DOUARIN, 1982

Demonstration of a cyclic renewal of the lymphocyte precursor cells in the quail thymus during embryonic and perinatal life

J. Immunol. 129, 1869-1877

KAPPLER, J., R. KUBO, K. HASKINS, C. HANNUM, P. MARRACK, M. PIGEON, B. McINTYRE, J. ALLISON and I. TROWBRIDGE, 1983

The Major Histocompatibility Complex-restricted Antigen Receptor on T Cells in Mouse and Man: Identification of Constant and Variable Peptides

Cell 35, 295-302

KEARNEY, J.F., A. RADBRUCH, B. LIESEGANG and K. ROJEWSKY, 1979

A new mouse myeloma cell line which has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody secreting cell lines

J. Immunol. 123, 1548-1550

KENNETT, R.H., K.A. DENIS, A.S. TUNG and N.R. KLINMAN, 1978

Hybrid Plasmacytoma Production: Fusions with Adult Spleen Cells, Monoclonal Spleen Fragments, Neonatal Spleen Cells and Human Spleen Cells

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 77-91

KIPPS, T.J., 1985

Switching the Isotype of Monoclonal Antibodies

In: Hybridoma Technology in the Biosciences and Medicine (Ed.: T.A. SPRINGER),
Plenum Press, New York and London, pp. 89-101

KLOTZ, F.W. and M.D. COOPER, 1986

A feline thymocyte antigen defined by a monoclonal antibody: (FT2) identifies a subpopulation of non-helper cells capable of specific cytotoxicity

J. Immunol. 136, 2510-2514

KÖHLER, G. and C. MILSTEIN, 1975

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity

Nature 256, 495-497

KÖHLER, G. and C. MILSTEIN, 1976

Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion

Eur. J. Immunol. 6, 511-519

KONDA, S., E. STOCKERT and R.T. SMITH, 1973

Immunologic properties of mouse thymus cells: membrane antigen patterns

Cell. Immunol. 7, 275-289

KOZBOR, D. and J.C. RODER, 1983

The production of monoclonal antibodies from human lymphocytes

Immunol. Today 4, 72-79

KÖHLMANN-RABENS, I., R. WANKE, F. STORANDT, B. ALTMANN, U. LOSCH and M. MERKENSCHLAGER, 1987

Attempts to localize the defect in dysgammaglobulinemia of UM-B19 chickens by studying the effect of immunomodulating substances on immunoglobulin and antibody production

Vet. Immunol. Immunopath. 14, 123-143

LEDBETTER, J.A., R.L. EVANS, M. LIPINSKI, C. CUNNINGHAM-RUNDLES, R.A. GOOD and L.A. HERZENBERG, 1981

Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man

J. Exp. Med. 153, 310-323

LEHNHARDT, W., J. ANDERSON, A. CONTINHO and F. MELCHERS, 1978

Cloning of murine transformed cell lines in suspension culture with efficiencies near 100%

Exp. Cell Res. 111, 309-316

LEVY, R., J. DILLEY and L.A. LAMPSON, 1978

Human normal and leukemia cell surface antigens. Mouse monoclonal antibodies as probes

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 164-169

LITTLEFIELD, J.W., 1964

Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants

Science 145, 709-710

LÖSCH, U., I. KÖHLMANN, W. KLUMPNER and H. FIEDLER, 1981

Course of serum-Ig concentrations in B12 chickens of the UM line

Immunobiol. 158, 416-425

MacDONALD, H.R., H. HENGARTNER and T. PEDRAZZINI, 1988

Intrathymic deletion of self reactive cells prevented by neonatal anti-CD4 antibody treatment

Nature 335, 174-176

McARTHUR, W.P., J. CHAPMAN and G.J. THORBECKE, 1971

Immunocompetent cells of the chicken. I. Specific surface antigenic markers on bursa and thymus cells

J. Exp. Med. 134, 1036-1045

MEUER, S.C., D.A. COOPER, J.C. HODGDON, R.E. HUSSEY, K.A. FITZGERALD, S.F. SCHLOSSMAN and E.L. REINHERZ, 1983

Identification of the Receptor for Antigen and Major Histocompatibility Complex on Human Inducer T Lymphocytes

Science 222, 1239-1242

MIEDEMA, F., J.W. van OOSTVEEN, R.W. SAUERWEIN, F.G.
TERPSTRA, L.A. AARDEN and C.J.M. MELIEF, 1985

Induction of immunoglobulin synthesis by interleukin 2
is T4⁺/T8⁻ cell dependent. A role for interleukin 2 in
the pokeweed mitogen-driven system

Eur. J. Immunol. 15, 107-112

MOORE, M.A.S. and J.T.T. OWEN, 1967

Experimental studies on the development of the thymus

J. Exp. Med. 126, 715-725

NATT, M.P. and C.A. HERRICK, 1952

A new blood diluent for counting the erythrocytes and
leucocytes of the chicken

Poultry Sci. 31, 735-738

OETTGEN, H.C. and C. TERHORST, 1987

The T-cell Receptor-T3 Complex and T-Lymphocyte
Activation

Human Immunology 18, 187-204

OUCHTERLONY, O., 1962

Diffusion in gel methods for immunological analysis II.

Prog. in Allergy 6, 30-154.

PEAULT, B., M. COLTEY and N.M. Le DOUARIN, 1982

Tissue distribution and ontogenetic emergence of
differentiation antigens on avian T cells

Eur. J. Immunol. 12, 1047-1050

PEAULT, B.M., J.P. THIERY and N.M. Le DOUARIN, 1983

Surface marker for hemopoietic and endothelial cell lineages in quail that is defined by a monoclonal antibody

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2976-2980

PESCOVITZ, M.D., J.K. LUNNEY and D.H. SACHS, 1984

Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL

J. Immunol. 133, 368-375

PETERS, J.H., H. BAUMGARTEN und M. SCHULZE, 1985

Monoklonale Antikörper:
Herstellung und Charakterisierung

Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York und Tokyo

PETERSON, R.D.A., B.R. BURMESTER, T.N. FREDERICKSON, H.G. PURCHASE and R.A. GOOD, 1964

Effect of Bursectomy and Thymectomy on the Development of Visceral Lymphomatosis in the Chicken

J. Nat. Cancer Inst. 32, 1343-2354

PINK, J.R., B. FEDEKA-BRUNER, M. COLTEY, B.M. PEAULT and N.M. Le DOUARIN, 1981

Biochemical characterization of avian T-lymphocyte specific antigens

Eur. J. Immunol. 11, 517-520

PINK, J.R. and A.M. RIJNBECK, 1983

Monoclonal antibodies against chicken lymphocyte surface antigens

Hybridoma 2, 287-296

PONTECORVO, G., 1975

Production of Mammalian Somatic Cell Hybrids by Means
of Polyethylene Glycol Treatment

Somat. Cell Genet. 1, 397-400

REINHERZ, E.L., L. MORETTA, M. ROPER, J.M. BREARD, M.C.
MINGARI, M.D. COOPER and S.F. SCHLOSSMAN, 1980

Human T lymphocyte subpopulations defined by FC
receptors and monoclonal antibodies. A comparison

J. Exp. Med. 151, 969-974

REINHERZ, E.L., P.C. KUNG, G. GOLDSTEIN and S.F. SCHLOSSMAN,
1979

Separation of functional subsets of human T cells by a
monoclonal antibody

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4061-4065

REINHERZ, E.L. and S.F. SCHLOSSMAN, 1980

The Differentiation and Function of Human T Lymphocytes
Cell 19, 821-827

SECHER, D., 1980

Monoclonal antibodies by cell fusion

Immunology Today 2, 22-26

SNOW, P.M. and C. TERHORST, 1983

The T8 antigen is a multimetric complex of two distinct
subunits on human thymocytes but consists of
homomultimeric forms on peripheral blood T lymphocytes

J. Biol. Chem. 258, 14675-14681

SOWDER, J.T., C.H. CHEN, L.L. AGER, M.M. CHAN and M.D. COOPER, 1988

A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T γ/δ receptor

J. Exp. Med. 167, 315-322

STAHLI, C., T. STAEBLEIN, V. MIGGIANO, J. SCHMIDT and P. HÄRING, 1980

High frequencies of antigen specific hybridomas: Dependence on immunisation parameters and prediction by spleen cell analysis

J. Immunol. Methods 32, 297-304

SUGIMOTO, M., T. YASUDA and Y. EGASHIRA, 1977

Development of the embryonic chicken thymus. I. Characteristic synchronous morphogenesis of lymphocytes accompanied by the appearance of an embryonic thymus-specific antigen

Dev. Biol. 56, 281-292

SUTER, L., J. BRÜGGEN and C. SORG, 1980

Use of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Screening of Hybridoma Antibodies against Cell Surface Antigens

J. Immunol. Methods 39, 407-411

TERHORST, C.A., 1984

Cell surface structures involved in human T lymphocyte specific functions: Analysis with monoclonal antibodies

In: Monoclonal Antibodies to Receptors: Probes for Receptor Structure and Function (Receptors and Recognition, Series B, Volume 17)
(Ed.: M.F. GREAVES) Chapman & Hall, London

TERHORST, C., A. van AGTHOVEN, E. REINHERZ and S. SCHLOSSMAN, 1980

Biochemical analysis of human T lymphocyte differentiation antigens T4 and T5

Science 209, 520-521

TRAILL, K.N., G. BÖCK, R.L. BOYD, K. RATHEISER and G. WICK, 1984

Ontogeny of surface markers on functionally distinct T cell subsets in the chicken

Eur. J. Immunol. 14, 61-67

WAYTES, A.T., L.D. BACON and N.R. ROSE, 1984

AT-1.1: A thymus-specific alloantigen of chickens

Immunogenetics 20, 359-371

WICK, G., B. ALBINI and F. MILGROM, 1973

Antigenic surface determinants of chicken lymphoid cells. I. Serologic properties of anti-bursa and anti-thymus sera

Clin. Exp. Immunol. 15, 237-249

Herrn Prof. Dr. U. Lösch danke ich herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. J. Cihak für die vorbildliche Einarbeitung und Betreuung sowie seine stete Diskussionsbereitschaft.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern der Labors Lösch, insbesondere Frau L. Mantel, für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Bei Herrn Dr. H.W. Löms Ziegler-Heitbrock vom Institut für Immunologie der Universität München möchte ich mich für die Durchführung und Auswertung der FACS-Analysen recht herzlich bedanken.

Für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz danke ich Herrn Prof. Dr. M. Merckenschlager und Herrn Prof. Dr. H. Zucker.

Lebenslauf:

- 14.04.1960 geboren in Simbach a.Inn als Sohn von Ludwig und Kreszenz Ammer, geborene Ballerstaller
- 1966 - 1970 Besuch der Grundschule in Simbach a.Inn
- 1970 - 1979 Besuch des Tassilo-Gymnasiums Simbach a.Inn
- 27.06.1979 Allgemeine Hochschulreife
- 04/1980 - Studium der Pharmazie an der Julius-
10/1980 Maximilians-Universität Würzburg
- 11/1980 - Studium der Tiermedizin an der Ludwig-
07/1986 Maximilians-Universität München
- 30.07.1986 Staatsexamen
- 20.08.1986 Approbation als Tierarzt
- 09/1986 Beginn der Arbeit an der vorliegenden
Dissertation
- 11/1986 - Stipendium des Freistaates Bayern zur
10/1988 Förderung des wissenschaftlichen und künstlerischen Nachwuchses

